

Medizinische Fakultät  
der  
Universität Duisburg-Essen

Aus dem Institut für Physiologische Chemie

**Untersuchungen zum Einfluss und zur Bioverträglichkeit von Perfluordekalin-  
gefüllten Poly(laktid-co-glykolid)-Mikrokapseln in einem Modell der Ratte**

I n a u g u r a l – D i s s e r t a t i o n  
zur  
Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften in der Medizin  
- Dr. rer. medic. -  
durch die Medizinische Fakultät  
der Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von  
Indra Naemi Waack  
aus Castrop-Rauxel  
2013

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer  
1. Gutachter: Herr Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. H. de Groot  
2. Gutachter: Herr Univ.-Prof. Dr. med. P. Horn  
3. Gutachter: Herr Prof. Dr. rer. nat. C. Schmuck, Essen

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Dezember 2013

## **Veröffentlichungen**

Ferenz KB, Waack IN, Laudien J, Mayer C, Broecker-Preuss M, de Groot H, Kirsch M. Safety of poly(ethylene glycol)-coated perfluorodecalin-filled poly(lactid-co-glycolid) microcapsules following intravenous administration of high amounts in rats. [Veröffentlichung in Vorbereitung]

Ferenz KB, Waack IN, Mayer C, de Groot H, Kirsch M. Long-circulating poly(ethylene glycol)-coated poly(lactid-co-glycolid) microcapsules as potential carriers for intravenously administered drugs. J Microencapsulation, 2013 Mar 14. [Epub ahead of print]

## **Vorträge**

Waack IN. Bioverträglichkeit von intravenös applizierten pegylierten Poly(laktid-co-glykolid)-Mikrokapseln im Rattenmodell. 18. Workshop „Zell- und Gewebeschädigung: Mechanismen, Protektion und Therapie“ (29.11.-01.12.2012 Xanten)

Waack IN, Ferenz KB, Kirsch M, de Groot H. Bioverträglichkeit von intravenös applizierten pegylierten Poly(laktid-co-glykolid)-Mikrokapseln im Rattenmodell. Medizinischer Forschungstag 2012 der Universität Duisburg-Essen (23.11.2012 Universitätsklinikum Essen)

Waack IN, Laudien J. Labelling and pharmacokinetic studies of PEG-PLGA microparticles as artificial oxygen carriers. 1. Nephrologischer Workshop (02.06.2012 Klinik für Nephrologie des Universitätsklinikums Essen)

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>7</b>
1.1	Hintergrund .....	7
1.2	Hämoglobinbasierte Blutersatzmittel und künstliche Sauerstoffträger auf Perfluorcarbonbasis .....	10
1.2.1	Hämoglobin-basierte Lösungen der ersten Generation und aktuelle Produkte.....	10
1.2.2	Eigenschaften der Perfluorcarbone und ihr Einsatz als Sauerstoffträger in Emulsionen der ersten und zweiten Generation sowie aktuelle Studien.....	11
1.3	Einsatz eines kapselbasierten Transportsystems mit Poly(laktid-co-glykolid) (PLGA) als biokompatibles Kapselwandmaterial bei der Synthese von Mikrokapseln .....	14
1.4	Problemstellung und Ziele der Arbeit.....	16
<b>2.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>17</b>
2.1	Chemikalien und Pharmaka .....	17
2.2	Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	18
2.3	Software.....	20
2.4	Synthese der Polyethylenglykol (PEG) beschichteten soliden bzw. mit Perfluordekalin (PFD) gefüllten Poly(laktid-co-glykolid) (PLGA) Mikrokapseln....	21
2.5	Versuchstiere .....	21
2.6	Anästhesie und Analgesie .....	22
2.7	Katheterisierung der Femoralgefäße .....	22
2.8	Biomonitoring .....	23
2.9	Blutgasanalyse und Plasmaparameter .....	24
2.10	Euthanasie und Organentnahme.....	26
2.11	Makroskopische Beurteilung der Dünndarmschädigung.....	26
2.12	Histologie .....	27
2.13	Rotationsthrombelastometrie.....	29
2.14	Bestimmung der soliden (PEG-PLGA) bzw. mit Perfluordekalin-gefüllten (PEG-PLGA+PFD) Mikrokapselanzahl mit dem Laser-Scanning-Mikroskop.....	30
2.15	Versuchsserien und Gruppen.....	31
2.15.1	Versuchsserie zur Bestimmung der intravasalen Halbwertszeit von soliden (PEG-PLGA) bzw. mit Perfluordekalin-gefüllten (PEG-PLGA+PFD) Mikrokapseln (Serie 1) .....	31
2.15.2	Versuchsserie zur Bestimmung der toxikologischen Auswirkungen der Infusion von Polyvinylalkohol (PVA) bzw. mit Perfluordekalin-gefüllten (PEG-PLGA+PFD) Mikrokapseln (Serie 2) .....	33
2.15.3	Versuchsserie zum Einfluss von N <sub>w</sub> -Nitro-L-argininmethylester und Phenylephrin auf die Hypotension während einer PEG-PLGA+PFD-Mikrokapselinfusion (Evaluierungsreihe).....	35
2.16	Statistik .....	37



<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>38</b>
3.1	Bestimmung der intravasalen Halbwertszeit von soliden (PEG-PLGA) bzw. mit Perfluordekalin-gefüllten (PEG-PLGA+PFD) Mikrokapseln (Serie 1) .....	38
3.1.1	Einfluss von <i>i.v.</i> applizierten soliden (PEG-PLGA) bzw. mit Perfluordekalin-gefüllten (PEG-PLGA+PFD) Mikrokapseln auf die Vitalparameter der Ratte .....	39
3.1.2	Einfluss von <i>i.v.</i> applizierten soliden (PEG-PLGA) bzw. mit Perfluordekalin-gefüllten (PEG-PLGA+PFD) Mikrokapseln auf Parameter der Blutgasanalyse, metabolische Parameter sowie Elektrolyte .....	41
3.1.3	Einfluss von <i>i.v.</i> applizierten soliden (PEG-PLGA) bzw. mit Perfluordekalin-gefüllten (PEG-PLGA+PFD) Mikrokapseln auf Enzymaktivitäten sowie die Konzentration freien Hämoglobins im Plasma .....	45
3.1.4	Untersuchungen zur Halbwertszeit von <i>i.v.</i> applizierten soliden (PEG-PLGA) bzw. mit Perfluordekalin-gefüllten (PEG-PLGA+PFD) Mikrokapseln .....	49
3.1.5	Einfluss von <i>i.v.</i> applizierten soliden (PEG-PLGA) bzw. mit Perfluordekalin-gefüllten (PEG-PLGA+PFD) Mikrokapseln auf die Dünndarmschädigung .....	50
3.2	Bestimmung der toxikologischen Auswirkungen einer Infusion von Polyvinylalkohol (PVA) bzw. mit Perfluordekalin-gefüllten (PEG-PLGA+PFD) Mikrokapseln (Serie 2) .....	51
3.2.1	Einfluss von <i>i.v.</i> appliziertem PVA bzw. mit Perfluordekalin-gefüllten (PEG-PLGA+PFD) Mikrokapseln auf die Vitalparameter der Ratte .....	53
3.2.2	Einfluss von <i>i.v.</i> appliziertem PVA bzw. mit Perfluordekalin-gefüllten (PEG-PLGA+PFD) Mikrokapseln auf Parameter der Blutgasanalyse, metabolische Parameter sowie Elektrolyte .....	54
3.2.3	Einfluss von <i>i.v.</i> appliziertem PVA bzw. mit Perfluordekalin-gefüllten (PEG-PLGA+PFD) Mikrokapseln auf Enzymaktivitäten sowie die Plasmanitritkonzentration ....	57
3.2.4	Einfluss von <i>i.v.</i> appliziertem PVA bzw. mit Perfluordekalin-gefüllten (PEG-PLGA+PFD) Mikrokapseln auf Gerinnungsparameter .....	61
3.2.5	Einfluss von <i>i.v.</i> appliziertem PVA bzw. mit Perfluordekalin-gefüllten (PEG-PLGA+PFD) Mikrokapseln auf Komplementaktivierung und Zytokinfreisetzung .....	63
3.2.6	Einfluss von <i>i.v.</i> appliziertem PVA bzw. mit Perfluordekalin-gefüllten (PEG-PLGA+PFD) Mikrokapseln auf histologische Veränderungen der Organstrukturen .....	69
3.3	Einfluss von N <sub>ω</sub> -Nitro-L-argininmethylester und Phenylephrin auf die durch PEG-PLGA+PFD-Mikrokapseln verursachte Hypotension (Evaluierungsreihe) .....	71
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>73</b>
4.1	Das Tiermodell .....	73
4.2	Intravasale Halbwertszeit der soliden (PEG-PLGA) bzw. mit Perfluordekalin-gefüllten (PEG-PLGA+PFD) Mikrokapseln .....	74
4.3	Bedeutung des Kapselkerns sowie des Emulgators von PEG-PLGA-Mikrokapseln für den mittleren arteriellen Blutdruck .....	77
4.4	Bedeutung des Kapselkerns sowie des Emulgators von PEG-PLGA-Mikrokapseln für Blut- und Plasmaparameter .....	83
4.5	Bedeutung des Kapselkerns sowie des Emulgators von PEG-PLGA-Mikrokapseln für Gewebestrukturen .....	86

<b>5.</b>	<b>AUSBLICK .....</b>	<b>89</b>
<b>6.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>91</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>92</b>
<b>8.</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>100</b>
8.1	Abkürzungsverzeichnis .....	100
	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>101</b>
	<b>LEBENS LAUF.....</b>	<b>102</b>

## 1. EINLEITUNG

### 1.1 Hintergrund

Blut setzt sich aus den zellulären Komponenten Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten und der umgebenden Flüssigkeit, dem zellfreien Blutplasma, zusammen. Als Bestandteil des Herz-Kreislauf-Systems steht es durch das verzweigte Gefäßsystem und dessen permeablen Wänden mit allen Organen und Geweben in engem Kontakt. Das Blut übernimmt als Transportsystem eine Vielzahl von Funktionen. Es ist verantwortlich für die Nähr-, Puffer-, Abwehr- und Reparaturfunktion und gewährleistet den Wärmehaushalt sowie die Aufrechterhaltung von Isoionie und Isotonie. Die bedeutendste Aufgabe jedoch ist der lebenswichtige Transport von Sauerstoff durch die Erythrozyten von der Lunge zu den peripheren Geweben, mit dem gleichzeitigen Abtransport von Kohlendioxid von den Geweben in die Lunge.

In der Lunge wird der inhalede Sauerstoff an das Hämoglobin der Erythrozyten gebunden. Dieses Protein besteht aus je zwei  $\alpha$ - und zwei  $\beta$ -Untereinheiten, welche je ein Sauerstoffmolekül über dessen Hämgruppe reversibel binden können (Kim und Greenburg 2004). Die Bindung von Sauerstoff erfolgt kooperativ, d.h. mit zunehmender Sättigung steigt die Sauerstoffaffinität (Mozzarelli *et al.*, 2010); beschrieben durch einen sigmoiden Verlauf der  $O_2$ -Dissoziationskurve. In den Geweben, die Sauerstoff für zelluläre metabolische Prozesse benötigen, unterliegt das Hämoglobin durch die Bindung von 2,3-Bisphosphoglycerat einer Konformationsänderung, die die Sauerstoffaffinität herabsetzt und damit die Sauerstoffabgabe erleichtert. Im Gegenzug bindet das Stoffwechselprodukt Kohlendioxid an das Hämoglobin (nur ein geringer prozentualer Anteil wird physikalisch gelöst) und wird mit dem Blut zu den Lungen transportiert. Derart werden etwa 20 % des gesamten Kohlendioxidgehaltes eliminiert, während der Rest durch das Enzym Carboanhydrase in Bikarbonat überführt und auf diesem Wege transportiert wird (Kim und Greenburg 2004). Lokale Bedingungen in der Lunge, wie z.B. ein höherer Sauerstoffpartialdruck ( $pO_2$ ), veranlassen die Dissoziation von 2,3-Bisphosphoglycerat, so dass eine erneute Konformationsänderung des Hämoglobins in den Zustand hoher Sauerstoffaffinität ausgelöst wird. Infolgedessen kann Sauerstoff wieder an Hämoglobin binden. Das dissoziierte Kohlendioxid wird exhalieret. Die Integrität dieses Kreislaufes, der Sauerstoffaufnahme, -transport und -abgabe, gewährleistet damit eine adäquate Oxygenierung aller Organe und Gewebe.

Kommt es infolge eines Traumas oder chirurgischen Eingriffs zu einem Blutverlust, führt eine gestörte Mikrozirkulation zu einer unzureichenden Gewebeoxygenierung, d.h. zu einem Ungleichgewicht zwischen Sauerstoffangebot und -bedarf. Folge dieser Hypoxie sind, abhängig von der Schwere der Hämorrhagie, u.a. nur bedingt reversible Organ- und Gewebeschäden. Moderate Blutverluste (10-15 %, Klasse I; Peitzman *et al.*, 1995) können sowohl präklinisch als auch innerklinisch erfolgreich mit einer Flüssigkeitstherapie mit kristalloiden oder kolloiden Infusionslösungen behandelt werden. Aufgrund des moderaten Verlustes von sauerstofftransportierenden Erythrozyten und der Wiederherstellung des Intravasalvolumens bleibt eine Hypoxie aus. Akut lebensbedrohliche Schockereignisse mit einem Blutverlust von mehr als 40 % (Klasse IV; Peitzman *et al.*, 1995) machen jedoch die Transfusion von allogenen Erythrozytenkonzentraten (EK) zwingend erforderlich, um eine anämische Hypoxie zu verhindern. Allerdings ist eine präklinische Flüssigkeitstherapie mit EKs zur Wiederherstellung eines angemessenen Intravasalvolumens und Sicherung eines adäquaten Sauerstofftransports nicht durchführbar. Eine, für die Haltbarkeit nötige Lagerung der Konzentrate bei 4 °C (Habler *et al.*, 2005), die Anzahl der Konserven die aufgrund der verschiedenen Blutgruppen mitgeführt werden müssen, sowie die Durchführung einer Kreuzprobe (Habler *et al.*, 2005) für alle für eine Transfusion vorgesehenen Konserven machen die Anwendung von EKs auf dem Notarztwagen nicht praktikabel. Aufgrund dessen ist die Entwicklung kompetenter artifizieller Alternativen, die als einfache Infusion sofort appliziert werden können, besonders für die Arbeit auf dem Notarztwagen, essenziell.

Neben der akut lebensbedrohlichen Notfallsituation eines traumatisch-hämorrhagischen Schocks, ist die Entwicklung künstlicher Sauerstoffträger auch in interdisziplinären Gebieten der adäquaten medizinischen (innerklinischen) Versorgung von Patienten essenziell. So ist der Einsatz u.a. zur Tumoroxygenierung oder zur Therapie einer durch Sepsis herbeigeführten Hypotension denkbar. Weiterhin werden eine Zunahme der Chemo- und Radiosensibilität sowie eine Verbesserung der Lagerung und Haltbarkeit von Spenderorganen angestrebt (Dinkelmann und Northoff 2003). Überdies könnten künstliche Sauerstoffträger während elektiver chirurgischer Eingriffe mit kalkuliertem Blutverlust eingesetzt werden. Eine erfolgreiche Therapie der Dekompressionskrankheit mit einer intravenös applizierten PFC-Emulsion konnte in einem Schweinemodell ebenfalls gezeigt werden (Spiess 2009).

Die hohe Zahl der Indikationen führt dazu, dass spezifische Eigenschaften von künstlichen Sauerstoffträgern zwingend erfüllt sein müssen (Tab.1, Auszug).

**Tabelle 1: Eigenschaften eines idealen künstlichen Sauerstoffträgers<sup>a</sup>**

<b>Eigenschaften</b>
einfache, sichere und schnelle Anwendung
einfache Lagerungsbedingungen bei Raumtemperatur
lange Haltbarkeit ohne Funktions- und Stabilitätsverlust
Sauerstoffbeladung in den Lungen, Transport zu und Abgabe in den Geweben
Aufrechterhaltung des arteriellen Blutdrucks, Säure-Base-Haushalts in den Geweben
nichttoxisch, keine Infektionsgefahr
ausreichend lange intravasale Verweildauer mit anschließendem Abbau innerhalb weniger Wochen

<sup>a</sup>modifiziert nach (Lowe 2003); (Dinkelmann und Northoff 2003).

Auch wenn in der Klinik die Therapie mit EKs prinzipiell möglich ist, sorgt u.a. eine allgemein rückläufige Spenderbereitschaft (Habler *et al.*, 2005) der Bevölkerung für Engpässe in der Versorgung mit Erythrozytenprodukten. Im Jahr 2009 wurden rund 4,9 Millionen Blutspenden in Deutschland abgegeben. Dies entspricht etwa 60 Blutspenden pro 1000 Einwohner und ist im europäischen und weltweiten Vergleich hoch. Demnach ist die deutsche Bevölkerung derzeit noch gut selbstversorgt. Der demografische Wandel wird jedoch, zusammen mit den Kosten für Herstellung, Handel und Lagerung der Konserven in Zukunft zu einer starken Einschränkung der Versorgung mit Blutprodukten bei gleichzeitigem Bedarfsanstieg führen (Henseler *et al.*, 2010). Blutspendedienste in Deutschland verkaufen zurzeit eine Einheit EK an Kliniken noch für 75-80 €; innerhalb der Europäischen Union variieren die Preise indes bereits zwischen rund 92 € in Belgien und 223 € in Irland (Hofmann *et al.*, 2009). Kostensteigerungen innerhalb des Transfusionswesens zum Einen durch kostspielige infektiologische Prätransfusionstests, festgelegt durch das Transfusionsgesetz (Transfusionsgesetz 1998), zum Anderen durch die Therapiepflicht transfusionsassoziierter Komplikationen nach Transfusion werden zusätzlich zu einer Verschärfung in der Transfusionsmedizin beitragen.

Akute transfusionsassozierte, nicht-infektiöse Folgeerkrankungen sind u.a. Fieber und Nesselsucht, primär ist aber die akute hämolytische Reaktion (Bundesärztekammer 2008) zu nennen. Verzögerte transfusionsbedingte Komplikationen können, trotz aufwendiger Labortests, transfusionsassozierte Virusinfektionen sein. Obwohl seit den 1980er Jahren aufgrund verbesserter Testverfahren die Infektionsgefahr (Sharma *et al.*, 2011), vor allem in den medizinisch besser versorgten Industrieländern stark gesunken ist, besteht das Risiko einer Ansteckung weiterhin (Habler *et al.*, 2005). Zwischen 1997 und 2010 wurden dem Paul-Ehrlich-Institut 49 wahrscheinliche bzw. gesicherte Fälle einer viralen Übertragung gemeldet (Paul-Ehrlich-Institut 2012).

Neben der Angst vor den beschriebenen Risiken entscheiden sich einige Patienten auch aus religiösen Gründen gegen eine konservative oder chirurgische Therapie, die die Verwendung von Blutprodukten impliziert.

Prinzipiell basiert die Entwicklung künstlicher Sauerstoffträger besonders auf zwei Ansätzen. Der Isolierung von humanem oder tierischen Hämoglobin und der vollsynthetischen Variante in Form von Perfluorcarbonen (PFC).

## **1.2 Hämoglobinbasierte Blutersatzmittel und künstliche Sauerstoffträger auf Perfluorcarbonbasis**

### **1.2.1 Hämoglobin-basierte Lösungen der ersten Generation und aktuelle Produkte**

Das extraerythrozytäre Hämoglobin zur Anfertigung Hämoglobin-basierter Lösungen wird primär entweder aus abgelaufenen menschlichen Blutkonserven, Schweine- und Rinderblut isoliert oder gentechnisch hergestellt. Je nach Ursprung des Hämoglobins treten Probleme auf, die die Anwendung dieser Produkte einschränken. So ist die Gewinnung von humanem Hämoglobin aus abgelaufenen Blutkonserven ebenso abhängig von deren prinzipieller Verfügbarkeit (Spenderbereitschaft) wie bei anderen Blutprodukten auch. Bei der Verwendung von tierischem Hämoglobin ist die Gefahr xenogener Krankheitsübertragungen nicht vollständig auszuschließen. Gentechnisch hergestelltes Hämoglobin ist zwar von der Spenderbereitschaft der Bevölkerung unabhängig und frei von Infektionsrisiken, jedoch in Produktion und anschließender Reinigung kostspielig (Schöler *et al.*, 2010).

Hämoglobin-basierte Sauerstoffträger der ersten Generation offenbarten zahlreiche Nebenwirkungen, die zumeist auf die Anwesenheit freien Hämoglobins im Plasma zurückzuführen sind. Zwei der wichtigsten Effekte freien Hämoglobins sind Nephrotoxizität und Vasokonstriktion (Habler *et al.*, 2005; Schöler *et al.*, 2010; Mozzarelli *et al.*, 2010). Die Dissoziation des Hämoglobintetramers in Dimere, die aufgrund des geringeren Gewichts der glomerulären Filtration unterliegen, führen zum Einen zur Entwicklung einer Nephrotoxizität. Zum Anderen führt die NO-Radikalfängereigenschaft der Hämoglobindimere zu hypertensiven Effekten (Mozzarelli *et al.*, 2010).

Aktuell ist in Europa und den USA lediglich jeweils ein Produkt für veterinär und humanmedizinische Anwendungen zugelassen. Die Indikation einer Anämie bei Hunden erlaubt den Einsatz von Oxyglobin® in den Vereinigten Staaten und der Europäischen

Union. Das in der Humanmedizin eingesetzte Pendant ist Hemopure<sup>®</sup>, ein mit Glutaraldehyd quervernetztes und polymerisiertes aufgereinigtes bovines Hämoglobin, das bisher nur in Südafrika (2001) und Russland (2010) für die Behandlung einer akuten chirurgischen Anämie zugelassen ist (Jahr *et al.*, 2012).

### 1.2.2 Eigenschaften der Perfluorcarbone und ihr Einsatz als Sauerstoffträger in Emulsionen der ersten und zweiten Generation sowie aktuelle Studien

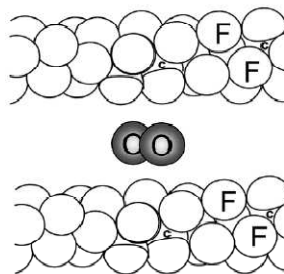
Erstmals konnten Clark und Gollan 1966 zeigen, dass Mäuse, die komplett in eine mit Sauerstoff angereicherte Fluorcarbon-Lösung eingetaucht wurden, in dieser und auch noch mehrere Wochen danach überlebten (Clark und Gollan 1966).

PFCs sind vollständig mit Fluoratomen substituierte zyklische oder azyklische Kohlenwasserstoffe. Sie besitzen ein ausgeprägtes Lösungsvermögen für Gase wie Sauerstoff und Kohlendioxid. Anders als bei Hämoglobin, das Sauerstoff chemisch an seine Hämgruppe bindet, werden die Gase in PFCs rein physikalisch gelöst (Abb.1). So ergibt sich eine direkte

Abhängigkeit zwischen der

Menge an gelöstem Sauerstoff und dem  $pO_2$ ; im Gegensatz zu dem kooperativen Anlagerungsprozess von Sauerstoff mit sigmoidalem Kurvenverlauf im Hämoglobin (Abb.2) (Dinkelmann und Northoff 2003). Der Sauerstoff wird in den intermolekularen Räumen der PFCs und weniger abhängig von Temperatur (Schöler *et al.*, 2010), pH, Kohlendioxidpartialdruck ( $pCO_2$ ) und 2,3-Bisphosphoglycerat (Habler *et al.*, 2005) transportiert. Aufgrund der linearen Abhängigkeit wird ein adäquater Sauerstoffgehalt der PFCs nur mit entsprechend hohem  $pO_2$  erreicht. Folglich müssen PFC-basierte Sauerstoffträger klinisch unter hohen inspiratorischen Sauerstoffkonzentrationen verabreicht werden, was eine Beatmung der Patienten nötig macht. Unter diesen

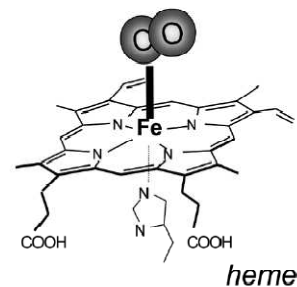
#### Perfluorochemicals



#### Loosely dissolved

(gas-like; no saturation)

#### Hemoglobin

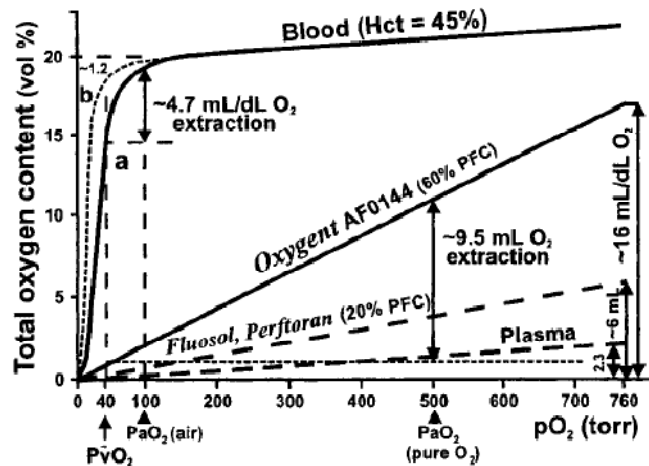


#### Strongly bound

**Abbildung 1: Sauerstofftransport durch Perfluorcarbone und Hämoglobin (Riess 2006).** Im Hämoglobin wird der Sauerstoff durch eine starke, chemische Bindung an das Eisenatom der Hämgruppe gebunden. Bei PFCs existieren lediglich lockere, ungerichtete van der Waals Wechselwirkungen.

Bedingungen ist der absolute Gehalt von Sauerstoff in den PFCs zwar immer noch niedriger als im Blut, jedoch können PFCs praktisch den gesamten gelösten Sauerstoff bei einem adäquaten  $pO_2$  an die Umgebung abgeben (Habler *et al.*, 2005).

Das hohe Lösungsvermögen von PFCs für verschiedene Gase sowie die Möglichkeit sie



**Abbildung 2: Gesamtsauerstoffgehalt (Riess 2001).**

Sauerstoffbindungskurve von Vollblut, zellfreiem Hämoglobin (d.h. in Abwesenheit von 2,3-Bisphosphoglycerat), Plasma und zwei unterschiedlich konzentrierten PFC Emulsionen.

in großen Mengen und frei von Infektionsrisiken herstellen zu können, machen sie zu einem kompetenten Gegenentwurf zu Hämoglobin-basierten Lösungen in der Entwicklung künstlicher Sauerstoffträger. Zudem sind PFCs aufgrund ihrer starken Kohlenstoff-Fluor-Bindung und der Abschirmung der Kohlenstoffkette durch die Fluoratome metabolisch inert (Habler *et al.*, 2005; Riess 2005). Der hydrophobe und zugleich lipophile Charakter der PFCs macht eine Emulgierung für

eine intravenöse Applikation erforderlich. Nach Phagozytose v.a. durch Zellen des Retikuloendothelialen Systems (RES) der Leber, Milz und Lunge (Dinkelmann und Northoff 2003) werden sie mittels Lipoproteinen langsam aus den Geweben wieder in die Zirkulation abgeben und über die Lungenpassage exhaliiert (Riess 2001). Die intravasale Halbwertszeit von PFCs ist aufgrund der relativ schnellen Elimination durch das RES dosisabhängig und liegt für Emulsionströpfchen mit einer Größe von  $0,2 \mu m$  bei 5 bis 9 Stunden (Habler *et al.*, 2005). Die biologische Halbwertszeit ist abhängig vom Molekulargewicht des verwendeten PFCs und beträgt z.B. für Perfluordekalin 7 Tage. Perfluordekalin ( $C_{10}F_{18}$ ; PFD) ist bereits häufig für den Einsatz in biologischen Systemen untersucht worden (Lowe 2003). Es kann bei einer Temperatur von  $37^\circ C$  pro Atmosphärendruck ( $1 \text{ atm} = 760 \text{ mmHg}$ ) ca. 40 ml/dl Sauerstoff lösen (Lowe 2001). Damit liegt die Kapazität, bei gleichen Bedingungen, deutlich über jener von Wasser bzw. Plasma mit etwa 2-3 ml/dl (Lowe 1987). Bei einer Überdosierung kommt es aufgrund der schnellen Phagozytose zu einer Akkumulation von Emulsionströpfchen im RES, was sich in einer transienten Immunsuppression manifestiert (Dinkelmann und Northoff 2003).

Fluosol® (Fluosol-DA, Green Cross Corp., Japan und Alpha Therapeutics, USA) und Perftoran® (Ftorosan, OJCS SPF Perftoran Russland), PFC-Emulsionen der ersten



Generation, haben aufgrund ihres jeweiligen verhältnismäßig niedrigen PFC-Anteils von 20 % bzw. 15 % nur ein limitiertes Sauerstofftransportvermögen (Castro und Briceno 2010). Da allerdings eine kurzzeitig verbesserte Gewebeoxygenierung durch Fluosol® möglich ist, erhielt dieses Produkt 1989 für die Indikation einer perkutanen transluminalen koronaren Angioplastie die Zulassung durch die amerikanische *Food and Drug Administration* (FDA). Die Ineffektivität von Fluosol® als Erythrozytenersatz bei akut anämischen Patienten (Hämoglobin 3,5-4,3 g/dl), die eine Transfusion aus religiösen Gründen ablehnten, zeigten dagegen zwei randomisierte und kontrollierte Studien (Habler *et al.*, 2005). Zudem rief der in Fluosol® verwendete Emulgator Poloxamer-188 (Pluronic F68) einige Nebenwirkungen wie Komplementaktivierung, Myalgie und Fieber, Anaphylaxie und eine kurzfristige Thrombozytopenie hervor (Castro und Briceno 2010). Diese Merkmale und die hohe Instabilität der Emulsion (separierte, tiefgefrorene Lagerung und Transport der Einzelkomponenten) führten schließlich zu dem kommerziellen Misserfolg von Fluosol®. Bereits nach vier Jahren wurde die Zulassung durch die FDA wieder entzogen (Habler *et al.*, 2005).

Als intravaskulärer Sauerstofftransporter zum kurzfristigen Einsatz bei der Perfusion menschlicher Organe und der Therapie des hämorrhagischen Schocks ist Perftoran® seit 1996 in Russland zugelassen. Auch in Kasachstan (1995), Ukraine, Mexiko (2005) und Kirgisistan (2006) erhielt die Emulsion Zulassung für den medizinischen Gebrauch. Wie Fluosol® enthält Perftoran® als Emulgator Proxanol 268 (Analogon zu Pluronic F68 in der ehemaligen UdSSR) und muss bei -4 bis -18 °C gelagert werden (Castro und Briceno 2010).

Gegenwärtig gibt es nur wenige Produkte der zweiten Generation von PFC-Emulsionen, die sich in präklinischen oder klinischen Studien befinden. Grundsätzlich sollen bei der Entwicklung dieser neuen Emulsionen die Schwierigkeiten der Produkte der ersten Generation überwunden werden. Dazu gehören der Einsatz natürlicher Emulgatoren in Form von Phospholipiden, die bessere Praktikabilität der Lagerungsbedingungen und eine zwei- bis viermal so hohe Sauerstofftransportkapazität (Castro und Briceno 2010). Aktuell befindet sich lediglich die PFC-Emulsion Oxycyte® (Oxygen Biotherapeutics 2013) in einer klinischen Phase-II-b-Studie. Im Rahmen dieser randomisierten, placebokontrollierten Doppelblind-Studie wird die Sicherheit und Verträglichkeit von Oxycyte® bei der Indikation eines schweren Schädel-Hirn-Traumas untersucht.

### 1.3 Einsatz eines kapselbasierten Transportsystems mit Poly(laktid-co-glykolid) (PLGA) als biokompatibles Kapselwandmaterial bei der Synthese von Mikrokapseln

Bisherige nennenswerte Entwicklungen Perfluorcarbon-basierter künstlicher Sauerstoffträger sind Emulsionen. Zur Synthese einer Emulsion bedarf es stets der Verwendung von grenzflächenaktiven Substanzen; den Emulgatoren. Diese stabilisieren über eine zeitlich begrenzte Phase die Emulsion bis es durch molekulare Diffusion zu einem Tröpfchenwachstum (Ostwald-Reifung) kommt (Riess 2005). Dies bedeutet gleichzeitig, dass der Emulgator nach der Synthese nicht mehr entfernt werden kann und meist hoch konzentriert eingebracht werden muss, um die Emulsion für eine adäquate Zeit stabilisieren zu können. Allerdings ist, wie bereits oben beschrieben, häufig der Emulgator für unerwünschte und gesundheitsschädliche Nebenwirkungen bei dem Einsatz von PFC-Emulsionen als künstliche Sauerstoffträger verantwortlich.

Aufgrund dessen wurden am Institut für Physiologische Chemie des Universitätsklinikums Essen beschichtete Poly(laktid-co-glykolid) (PLGA) Mikrokapseln mit PFD-Inhalt entwickelt. Vorteile bei der Synthese und Zusammensetzung eines kapselbasierten Systems sind die Verwendung von biokompatiblen Kapselwandmaterial, einer vernachlässigbaren Menge des Emulgators sowie der Möglichkeit, die synthetisierten Kapseln in jeder beliebigen Infusionslösung (0,9 % Kochsalzlösung, Ringer-Lösung etc.) zu resuspendieren. Ein weiterer Vorteil liegt darin, dass die PLGA-Mikrokapseln auch mit anderen Wirkstoffen gefüllt werden können und somit auch eine kompetente Möglichkeit für einen zielgerichteten Arzneimitteltransport darstellen.

Zudem liegt der mittlere Durchmesser der im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Kapseln im Mikrometerbereich, wenngleich in der Literatur überwiegend der Einsatz von Nanosystemen postuliert wird. Die Verwendung von Mikropartikeln ist jedoch bei spezifischen Fragestellungen derjenigen von Nanopartikeln vorzuziehen. Geht es zum Beispiel darum, einen konstanten therapeutischen Arzneimittelspiegel im Blut zu halten oder einen polytraumatisierten Patienten präklinisch mit Sauerstoff zu versorgen, so ist eine lange intravasale Halbwertszeit zielgebend. Die Applikation von Nanopartikeln erwies sich in diesem Fall als kontraindiziert, denn Nanosysteme werden bis zu einer Größe von 500 nm bevorzugt durch vaskuläre Zellen aufgenommen (Nguyen *et al.*, 2009). Dabei sind vor allem Endothelzellen für eine schnellere Entfernung aus der Blutzirkulation verantwortlich. Die Eliminierungsrate wird zudem beim Auftreten von Endothelzellschäden, ausgelöst durch verschiedene Krankheiten (z.B. Krebs) oder in pathophysiologischen Situationen (z.B. Ischämie), noch erhöht (Cole *et al.*, 1995; Gryparis *et al.*, 2007).

Die Synthese der PLGA-Mikrokapseln (sowohl solide als auch PFD-gefüllte) basiert auf dem Evaporationsverfahren nach Pisani *et al.* (Pisani *et al.*, 2006) und ist im *Journal of Microencapsulation* (Ferez *et al.*, 2013) veröffentlicht. Diese Technik ist bei der Synthese von Mikropartikeln weit verbreitet (Lee *et al.*, 1999; Mundargi *et al.*, 2008). PLGA ist eines der meist untersuchten und verfügbaren Polymere in der Entwicklung von Arzneimitteltransportsystemen (Makadia und Siegel 2011). Es sind bereits Präparate auf PLGA-Mikrokapselbasis zur inneren Anwendung am Menschen von der FDA zugelassen (Song *et al.*, 2010). Gegenwärtig wird es routinemäßig bei der Herstellung von subkutan, intramuskulär und intragluteal injizierbarer Mikrosphären eingesetzt. Diese Sphären sollen im Organismus Arzneidepots bilden, die eine kontinuierliche Wirkstoffabgabe gewährleisten und die Häufigkeit der Arzneigabe reduzieren. Zudem können peptid- und proteinhaltige Medikamente, die normalerweise schnell aus dem Organismus eliminiert werden durch die Einkapselung verabreicht werden und weisen dadurch eine verlangsamte Wirkstofffreisetzung auf. Darüber hinaus wird PLGA als Nahtmaterial, Knochenfixativ oder als Material in der Zahnmedizin verwendet (Tamilvanan 2007). In den letzten Jahren traten PLGA-Nanopartikel mehr und mehr in den Vordergrund, um die Effektivität intravenös applizierter Wirkstoffe zu verbessern. Besonders interessant ist dies zum Einen bei der Verwendung aktiver Komponenten, die direkt mit dem Blut in Kontakt stehen, wie Wirkstoffe gegen Malaria (Santos-Magalhães und Mosqueira 2010). Zum Anderen um unerwünschte dosislimitierende Nebenwirkungen v.a. in der Krebstherapie zu verringern (Avgoustakis *et al.*, 2002; Dinarvand *et al.*, 2011), oder die Applikation von Wirkstoffen (z.B. Amphotericin B), die prinzipiell eine begrenzte therapeutische Wirkung besitzen, zu ermöglichen (van de Ven *et al.*, 2012). Der Abbau von PLGA erfolgt durch die hydrolytische Spaltung der Esterbindungen in der Polymerhauptkette, so dass Milchsäure und Glycolsäure entstehen. Aufgrund der jeweiligen  $pK_s$ -Werte liegen beide Säuren unter physiologischen Bedingungen deprotoniert, d.h. als Laktat bzw. Glycolat vor. Laktat wird in den Citratzyklus eingeschleust, dort metabolisiert und anschließend als Kohlendioxid und Wasser aus dem Organismus eliminiert. Glycolat wird entweder unverändert über die Nieren oder ebenfalls über den Citratzyklus in Form von Kohlendioxid und Wasser ausgeschieden (Jain 2000).

Das zur Synthese der soliden Kapselwand verwendete PLGA-Copolymer eignet sich aufgrund seiner Biokompatibilität, der mechanischen Festigkeit und biologischen Abbaubarkeit (Dinarvand *et al.*, 2011) demnach besonders gut für einen Einsatz *in vivo*.

#### 1.4 Problemstellung und Ziele der Arbeit

Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten, mit Polyethylenglykol (PEG) beschichteten, PLGA-Mikrokapseln sollen längerfristig als artifizielle Arzneimittel- oder Sauerstofftransportsysteme bei der routinemäßigen Versorgung von Patienten ihre Anwendung finden.

Daher liegt der thematische Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit zunächst darin, in einer ersten Versuchsserie, die intravasale Halbwertszeit der infundierten soliden bzw. PFD-gefüllten PEG-lierten Poly(laktid-co-glykolid)-Mikrokapseln (PEG-PLGA bzw. PEG-PLGA+PFD) in einem experimentellen Modell der Ratte zu bestimmen. Neben der Verweilzeit im Blutkreislauf soll ein erster Überblick zur Verträglichkeit der infundierten Mikrokapseln dokumentiert und ausgewertet werden. Dazu werden durch die Infusion der Mikrokapseln induzierte Veränderungen auf systemische Parameter (Vitalparameter, Blutgasanalyse) sowie eventuell hervorgerufene Organschädigungen (Markerenzymfreisetzung) untersucht.

Die Evaluierung der ersten Versuchsserie dient als Grundlage für ein toxikologisches *Screening* im Rahmen einer zweiten Versuchsserie, in der allerdings aufgrund des längerfristigen Ziels künstliche Sauerstoffträger zu entwickeln, lediglich die PEG-PLGA+PFD-Mikrokapseln eingesetzt werden sollen. In früheren Arbeiten anderer Arbeitsgruppen, die sich mit artifiziellen Sauerstofftransportsystemen beschäftigen, wird häufig der zur Kapselsynthese eingesetzte Emulgator, oder dessen Kombination mit einem Perfluorcarbon, für auftretende pathologische Veränderungen nach Applikation des Produkts verantwortlich gemacht. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Mikrokapseln werden mit einem neuen, bisher für Kapselsysteme kaum eingesetzten Emulgator, dem niedermolekularen Polyvinylalkohol (PVA), synthetisiert. Daher soll eine eigenständige PVA-Versuchsgruppe im Rahmen des toxikologischen *Screenings* eingeführt werden. Um möglicherweise aufgetretene Schädigungen oder Reaktionen des Immunsystems beurteilen zu können, werden neben den Routineparametern (Vitalfunktion, Blutgasanalyse, Histologie und Markerenzymfreisetzung) auch typische Inflammationsparameter wie die Freisetzung von Zytokinen und Komplementfaktoren gemessen.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Chemikalien und Pharmaka

**Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Chemikalien und Pharmaka.**

Hersteller	Substanz/Produkt
Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland	Forene®, Isofluran
AstraZeneca GmbH, Wedel, Deutschland	Xylocain 1 %ig (Lidocainhydrochlorid-Monohydrat)
B. Braun AG, Melsungen, Deutschland	Isotone Kochsalzlösung 0,9 %
Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland	Bio-Plex™ Cytokine Assay
Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)
Ceva Tiergesundheit GmbH, Düsseldorf, Deutschland	Ketamin 10 %ig als Hydrochlorid
Cusabio®, Wuhan, China	ELISA Kit, Rat complement fragment 4a
DiaSys Diagnostic Systems GmbH, Holzheim, Deutschland	ALAT (GPT) FS (IFCC mod.)
	ASAT (GOT) FS (IFCC mod.)
	CK-NAC FS
	Creatinine FS
	LDH FS IFCC
Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland	Freeflex®, Ringerlösung
GenWay Biotech, Inc, San Diego, CA, USA	ELISA Kit, Rat Complement Factor 3
Leica Biosystems GmbH, Nussloch, Deutschland	Schlittenmikrotom Hn 40
Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	Natriumnitrit
	Giemsa's Azur-Eosin-Methylenblaulösung für die Mikroskopie
	May-Grünwalds Eosin-Methylenblaulösung modifiziert für die Mikroskopie
	Puffertabletten pH 6,8 zur Herstellung von Pufferlösung nach WEISE
	di-Kaliumhydrogenphosphat
	Kaliumdihydrogenphosphat
	N <sup>G</sup> -Nitro-L-arginine Methyl Ester, Hydrochloride; CAS 51298-62-5; Calbiochem
R-Biopharm AG, Darmstadt, Deutschland	Nitrat Test-Kit
Roche, Mannheim, Deutschland	Laktatdehydrogenase
	Complete® Proteaseinhibitor
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland	Formalin solution, neutral buffered 10 %
	Fluorescein isothiocyanate dextran

Hersteller	Substanz/Produkt
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland	(M=150000 g/mol)
	Pyruvat
	Naphthylethylendiamin-Dichlorid
	Sulfanilamid
	Eukitt® quick-hardening mounting medium for microscopy
	R-(-)-Phenylephrine hydrochloride

## 2.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien.**

Hersteller	Substanz/Produkt
Aldasorber®, Shirley Aldred, England	Cardiff Aldasorber (Aktivkohlefilter)
ASMUTH Medizintechnik GmbH, Minden, Deutschland	Medizinische Temperatursonde D-RB3
B. Braun AG, Melsungen, Deutschland	Perfusor®-Leitung
	Perfusor®-Spritze, 50 ml
	Perfusor® Secura FT
	Infusionsgerät, IntrafixPrimeline
	Introcan Safety® Sicherheitsvenenverweilkanüle 16G
BD (Becton, Dickinson and Company), Franklin Lakes, USA	Microlance Kanülen, 0,6 mm x 30 mm
Brand GmbH & Co KG, Wertheim, Deutschland	Mikro-Hämatokrit-Kapillare, Natrium-heparinisiert
	Hämatokrit-Versiegelungskit
Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland	Objektträger, SuperFrost®, blau, geschnitten
Drägerwerk AG, Lübeck, Deutschland	Trajan 808 Narkosegerät
	Isofluran Vet. Med. Vapor
Engelbrecht Medizin-und Labortechnik GmbH, Eckermünde, Deutschland	Objektträger, geschnitten, Mattrand
Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland	Chirurgische Instrumente
Hellma, Mühlheim, Deutschland	Ultra-Mikro-Quarzküvetten
Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland	Trockenschrank B6760
Hettich, Tuttligen, Deutschland	Hämatokrit-Zentrifuge Universal 320R
Karl Beese GmbH, Barsbüttel, Deutschland	Bee Sana®, Vliesstoffkompressen
Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland	Feinwaage 770
Leica, Wetzlar, Deutschland	Rotationsmikrotom RM2235

Hersteller	Substanz/Produkt
MaiMed GmbH, Neuenkirchen, Deutschland	Wattestäbchen
Medax GmbH & Co KG GmbH, Rendsburg, Deutschland	beheizbarer Kleintier OP-Tisch
Medex Medical Ltd, Rossendale, England	MX960 Druckwandler
Medfusion Inc, Raleigh, USA	Spritzenpumpe Model 2010
MediPlac® GmbH, Borchen, Deutschland	Druckmanschette
Midmark, Orchard Park, USA	Matrx Anesthetic Gas Scavenger
Nellcor, Boulder, CO, USA	Pulsoxymetriesensor
Pentapharm, München, Deutschland	ROTEM Vollblut Hämostase-System
Radiometer GmbH, Willich, Deutschland	PICO50 Probennehmer mit 80 IU Elektrolyt-kompensiertem Heparin
	ABL 715 Blutgasanalyse-Gerät
Resorba®, Nürnberg, Deutschland	Chirurgisches Nahtmaterial (Seide, nicht resorbierbar)
Retsch, Haan, Deutschland	Schwingmühle MM200
Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland	Tube, 50 ml
	Tube, 12 ml
	Micro tube, 1 ml, 2 ml
	Citrat-Monovette, Tri-Natriumcitrat, c=0,106 mol/L
	EDTA-Monovette, 1,6 mg EDTA/ml Blut
	Tissue Culture Dish, 35 x 10 mm
Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Deutschland	Ministart Syringe Filter, 0,20 µm
	Vivaspin 500
Siemens Medical Electronics, Danvers, MA, USA	Sirecust 1281 Biomonitor
Smiths Medical GmbH, Grasbrunn, Deutschland	Vierwegehahn
	Poretex™ Polyäthylen-Schläuche, 0,58 mm ID, 0,96 mm OD
	Dreiwegehahn + Spülsystem (Druckdom)
Tem Innovations GmbH, München, Deutschland	Rotationsthrombelastometrie-Küvetten, Cup & Pin pro
Tem Innovations GmbH, München, Deutschland	Recalcifizierungsreagenz, 0,2 mol/l CaCl <sub>2</sub>
Terumo® Europe N.V., Leuven, Belgien	Spritzen, 1 ml, 2 ml, 5 ml und 10 ml
Thermo Fisher Scientific®, Bonn, Deutschland	Heraeus® Biofuge pico
	Heraeus® Biofuge primo R
Thermo Fisher Scientific®, Kalamazoo, MI, USA	Shandon Cassette/Biopsy, white
TKA, Niederelbert, Deutschland	Reinstwassersystem Typ HP 6 UV/UF

Hersteller	Substanz/Produkt
Varian, Darmstadt, Deutschland	Cary 100 Scan Spectrophotometer
Vital Scientific, Spankeren, Niederlande	Vitalab Selectra E
Zeiss AG, Jena, Deutschland	Lichtmikroskop
	AxioCam MRc (Kamera)
	Laser Scanning Mikroskop Typ LSM510
	Axio Imager.A1 (Mikroskop)+Software AxioVision Rel.4.6

## 2.3 Software

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Software.

Programm	Hersteller
Excel 2007	Microsoft, Officepaket 2007
Xlstat 2010	Addinsoft, Statistikprogramm
AxioVision Rel.4.6	Zeiss AG
Photoshop	Adobe



## 2.4 Synthese der Polyethylenglykol (PEG) beschichteten soliden bzw. mit Perfluordekalin (PFD) gefüllten Poly(laktid-co-glykolid) (PLGA) Mikrokapseln

Die soliden bzw. mit PFD-gefüllten PEG-lierten PLGA-Mikrokapseln (PEG-PLGA bzw. PEG-PLGA+PFD) wurden am Institut für Physiologische Chemie des Universitätsklinikums Essen synthetisiert und freundlicherweise von Prof. Dr. Michael Kirsch zur Verfügung gestellt.

Die Mikrokapseln wurden basierend auf dem Emulsions-Evaporations Verfahren nach Pisani *et al.* für Kapseln im Mikrometerbereich hergestellt (Ferez *et al.*, 2013). Der Durchmesser der synthetisierten Mikrokapseln lag bei  $1,5 \pm 0,8 \mu\text{m}$ .

Für die Tierversuche der Versuchsserien (2.15) wurden sowohl die soliden als auch die PFD-gefüllten Mikrokapseln in 10 ml steriler 0,9 % NaCl-Lösung dispergiert und durch einen Spritzenfilter ( $2,7 \mu\text{m}$  Porengröße) filtriert. Diese Kapselsuspension wurde den Tieren dann mit Hilfe einer Spritzenpumpe intravenös appliziert. Aufgrund des höheren Gewichts der mit PFD-gefüllten gegenüber soliden Mikrokapseln, wurde mittels einer Hämatokritzentrifuge ein Volumenanteil der Kapselsuspensionen von  $9 \text{ vol.-%} \pm 1 \text{ vol.-%}$  eingestellt. Durch die Wahl dieser Methode ergab sich eine Messunsicherheit von circa 11 %, wodurch es zu Schwankungen in der Kapselkonzentration (2.15.1; 2.15.2; 2.15.3) kam. Zur Bestimmung der Kapselkonzentration wurden 500  $\mu\text{l}$  der jeweiligen Suspension ( $9 \text{ vol.-%} \pm 1 \text{ vol.-%}$ ) in einem zuvor gewogenen 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß zentrifugiert ( $4000 \times g$ , 15 min, RT). Im Anschluss wurde der Überstand abpipettiert und das Pellet erneut gewogen. Nach Subtraktion des Leergewichts des Eppendorf-Reaktionsgefäßes konnte die Kapselkonzentration in mg/ml errechnet werden.

## 2.5 Versuchstiere

Alle Versuche wurden mit männlichen Wistar-Ratten (WIS/WU), die zwischen 400-480 g wogen, basierend auf der Tierversuchsgenehmigung Aktenzeichen: 84-02.04.2011.A361; TSG-Nr.: G1242/11 des Landesamtes für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen durchgeführt. Die Haltung und Aufzucht der Versuchstiere erfolgte nach geltenden Tierschutzgesetzen und unter standardisierten Bedingungen (konstante Raumtemperatur,  $21 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ; Luftfeuchtigkeit,  $55 \% \pm 5 \%$ ; zwölfständiger Hell-/Dunkelrhythmus) durch das Zentrale Tierlaboratorium des Universitätsklinikums Essen. Futter (ssniff®-Spezialdiäten, Soest, Deutschland) und Wasser standen den Tieren *ad libitum* zur Verfügung.

## 2.6 Anästhesie und Analgesie

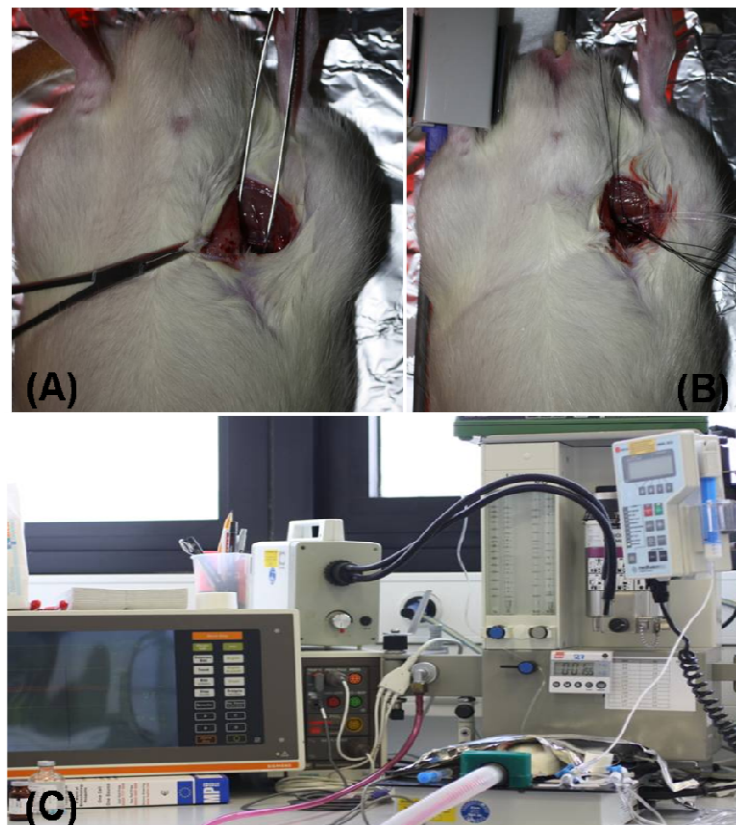
Die Versuchstiere wurden zur Allgemeinanästhesie zunächst in einen Begasungstopf gesetzt, der langsam mit Isofluran (2 vol.-% in 100 % medizinischem O<sub>2</sub> bei einem Durchfluss von 4 l/min) geflutet wurde. Die Tiere blieben bis zu dem gewünschten Narkosestadium in dem Begasungstopf und wurden anschließend zügig in Rückenlage auf einen beheizbaren OP-Tisch (Temperatur 37-40 °C) für Kleintiere gelegt. Die Inhalationsanästhesie wurde über eine am OP-Tisch angebrachte Narkosemaske (1,5-2 vol.-% Isofluran in 100 % medizinischem O<sub>2</sub> bei 1 l/min) fortgeführt. Die Analgesie wurde durch die subkutane Injektion von Ketamin (50 mg/kg Körpergewicht (KGW)) in die rechte Bauchseite erwirkt. Zur Lokalanästhesie des OP-Gebietes wurde Lidocain (5 mg/kg KGW), ebenfalls subkutan, in die rechte Leiste injiziert. Die Zunge der Tiere wurde exponiert, um einen Verschluss der Atemwege zu verhindern.

Eine durchgehend adäquate Analgesie war, durch die Nachdosierung von Ketamin (25 mg/kg KGW) bei Wiederauftreten des Zwischenzehen- und Kornealreflexes sichergestellt.

## 2.7 Katheterisierung der Femoralgefäße

Damit die nötige Narkosetiefe zweifelsfrei festgestellt werden konnte, wurden bei den Versuchstieren sowohl der Zwischenzeh- als auch der Kornealreflex überprüft. Blieben diese ohne Reaktion, erfolgte nach einer etwa zwei Zentimeter langen Inguinalinzision in der rechten Leiste die Präparation und Katheterisierung der *Arteria* und *Vena femoralis dexter*. Dazu wurde unter der Verwendung von zwei Wattetupfern in die Tiefe präpariert, bis beide Gefäße und das *Ligamentum inguinale* zu sehen waren. Sowohl die Arterie als auch die Vene wurden behutsam von dem assoziierten Muskelgewebe und dem *Nervus femoralis* getrennt und anschließend von Faszien und Bindegeweben befreit und voneinander separiert. Damit das Biomonitoring zeitnah gestartet und die Vitalparameter frühestmöglich überprüft werden konnten, erfolgte zunächst die Katheterisierung der *Arteria femoralis* (Abbildung 3A). Dazu wurde sie mit einer feinen Pinzette angehoben, distal ligiert und proximal angeschlungen. Anschließend wurde die Arterienwand mit einer Gefäßschere angeschnitten, der luftblasenfreie Katheter (gefüllt mit Ringerlösung) eingeführt und mit der proximal liegenden Schlinge fixiert. Um eine zusätzliche Stabilisierung des Katheters zu gewährleisten, war eine weitere Befestigung mit der distalen Ligatur erforderlich. Im Anschluss wurde die Pinzette entfernt. Die Platzierung des venösen Katheters (definierte Länge: 20 cm) erfolgte analog im Anschluss an die

Platzierung des Arterienkatheters (Abbildung 3B). Um ein Austrocknen der Wunde zu verhindern, wurde sie mit einer feuchten (0,9 % NaCl-Lösung) Vliesstoffkompressen abgedeckt. Weiterhin wurde zur Kompensation des Flüssigkeitsverlusts durch die Operationswunde und das respiratorische Flimmerepithel über den venösen Zugang während des gesamten Versuchszeitraums 0,9 % NaCl-Lösung mit einer Perfusionsrate von 5 ml/kg KGW·h infundiert. Unterbrochen wurde die Flüssigkeitssubstitution dabei lediglich während der Infusionsphase, der in 2.15 dargestellten versuchsgruppenabhängigen Lösungen.



**Abbildung 3: Operationsplatz und Katheterisierung der Femoralgefäße.** (A) Zur Katheterisierung mit einer Pinzette angehobene *Arteria femoralis*. (B) Katheterisierte *Arteria* und *Vena femoralis*. (C) Übersicht OP-Platz mit Biomonitor (links), Narkosegerät (Hintergrund), Spritzenpumpe (rechts) und beheizbarem Kleintier OP-Tisch (vorne).

## 2.8 Biomonitoring

Die kontinuierliche Überwachung der Vitalparameter und deren Dokumentation erfolgte alle zehn Minuten während des gesamten Versuchszeitraumes. Lediglich in der Infusionsphase der versuchsgruppenabhängigen Lösungen wurden die Vitalparameter in

fünf Minutenintervallen notiert, um bereits kleinste Veränderungen lückenlos darstellen zu können.

Durch die Verbindung des Arterienkatheters mit einem Druckumwandler konnten der systolische, diastolische und mittlere arterielle Blutdruck (MAP) auf einem Monitor gemessen und abgelesen werden. Dazu wurde der Katheter mittels einer Druckmanschette unentwegt mit Ringerlösung (3 ml/h) durchspült. Weiterhin konnte durch Abzählen der systolischen Blutdruckpeaks die Herzfrequenz am Monitor abgelesen werden.

Die Atemfrequenz ließ sich anhand der Atembewegungen pro Minute ermitteln.

Durch das circa zwei Zentimeter tiefe Einführen einer Temperatursonde in den Enddarm wurde die Körpertemperatur kontinuierlich überwacht und dokumentiert. Zur Überprüfung der peripheren Sauerstoffsättigung des Blutes wurde an der linken Hinterpfote ein Pulsoxymetriesensor angebracht.

## 2.9 Blutgasanalyse und Plasmaparameter

Die Blutabnahmen erfolgten zu verschiedenen Zeitpunkten und versuchsserienabhängig (2.15), aber in jedem Fall direkt nach Platzierung des Arterienkatheters, mit einem Volumen von 0,5 ml über den arteriellen Zugang. Dafür wurden 2 ml volumenfassende und 80 IU elektrolyt-kompensiertes Heparin enthaltene Aspiratoren verwendet. Nach jeder Blutentnahme wurden den Tieren zwecks Flüssigkeitsausgleiches und Erhaltung der Katheterdurchgängigkeit 0,5 ml 0,9 % NaCl-Lösung über die *Arteria femoralis* injiziert.

Die Messung der Partialdrücke von arteriellem Sauerstoff ( $pO_2$ ) und Kohlenstoffdioxid ( $pCO_2$ ), sowie die Bestimmung von arterieller Sauerstoffsättigung, pH-Wert, Hämoglobingehalt, Hämatokrit, *Base Excess* (BE), Standardbicarbonat, Elektrolytkonzentrationen ( $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cl^-$ ) und der metabolischen Parameter Glukose und Laktat erfolgte mit einem Blutgasanalysegerät.

Nach der Blutgasanalyse wurde das übrige Blut in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß zentrifugiert (4000 x g, 15 min, RT), um anschließend das überstehende Plasma vorsichtig abzupipettieren. Die Plasmaproben wurden bis zur weiteren Verwendung (am selben Tag) bei 4 °C gelagert. Die Bestimmung der Enzymaktivitäten von Laktatdehydrogenase (LDH), Alaninaminotransferase (ALAT), Aspartataminotransferase (ASAT) und Kreatinkinasen (CK-NAC) in dem gewonnenen Plasma erfolgte mittels eines automatischen Analysesystems.

Im Rahmen der zweiten Versuchsserie (2.15.2) wurden den Tieren am Ende des Versuches mit einem Aspirator, der 80 IU elektrolyt-kompensiertes Heparin enthielt, final noch einmal 2 ml arterielles Blut abgenommen und für die folgenden Messungen zentrifugiert (4000 x g, 15 min, RT), um Plasma zu gewinnen:

Im Zentrallabor des Universitätsklinikums Essen wurden mittels rattenspezifischer ELISA-Kits bzw. eines rattenspezifischen Bio-Plex™ Cytokine Assays die Komplementfaktoren 3 (C3) und 4a (C4a), sowie die Zytokine Interferon-gamma (IFN-γ), Interleukin-1alpha (IL-1α), IL-1β, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und der Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-α), aus dem Heparinplasma bestimmt.

Ebenfalls aus Heparinplasma ist das freie Hämoglobin als Nachweis einer möglichen Hämolyse photometrisch durch das Soret-Banden-Maximum ermittelt worden. Hierfür wurden mit einem Spektrophotometer die verdünnten Proben (20 µl Plasma + 100 µl 0,9 % NaCl-Lösung) in Ultra-Mikro-Quarzküvetten in einem Wellenlängenbereich von 400-475 nm gemessen. Nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz konnte dann die Hämoglobinkonzentration [µM] wie folgt errechnet werden:

$$c = \frac{Abs_{max.} - Abs_{475}}{\varepsilon \cdot d} \cdot 10^6 \cdot VF$$

**Formel 1: Lambert-Beer-Gesetz**

Abs<sub>max.</sub>: gemessenes Absorptionsmaximum; VF: Verdünnungsfaktor;  
Abs<sub>475</sub>: Absorption bei 475 nm; d: Schichtdicke;  
ε: molarer Extinktionskoeffizient von Hb (131.000 x mol<sup>-1</sup> x cm<sup>-1</sup>)

Für die Bestimmung der kumulativen Konzentration von Nitrit und Nitrat als Maß für die Bildung von Stickstoffmonoxid wurden den Tieren der zweiten Versuchsserie final 1,5 ml arterielles Blut mittels einer EDTA-Monovette abgenommen. Nach Zentrifugation (4000 x g, 15 min, RT) wurden die Plasmaproben bis zur Messung, basierend auf der Griess-Reaktion (Reduktion von Nitrat zu Nitrit; Green *et al.*, 1982), bei -80 °C gelagert. Für die Bestimmung wurde ein kommerzielles Nitrat-Test-Kit (beinhaltete Nitrat-Reduktase, Imidazol-Puffer pH 7,8) verwendet. Das Griess-Reagenz wurde im Verhältnis 1:1 aus 0,1 % Naphthylethylendiamin-Dichlorid und 1 % Sulfanilamid in 5 %iger Phosphorsäure angesetzt. Im Vorfeld mussten die Plasmaproben durch zentrifugale Ultrafiltration (16.000 x g, 30 min, 4 °C) gereinigt werden, was eine vorherige Säuberung der Filter mit *Aqua bidest.* voraussetzte. Im Anschluss an die Filtration wurden die verwendeten Reagenzien und Substrate wie folgt eingesetzt:

- 50 µl Filtrat (Probe) oder Standard aus Verdünnungsreihe
- + 50 µl Phosphatpuffer (50 mM, pH 7,4)
- + 50 µl Imidazolpuffer (mit 0,5 mg NADPH/ml und 0,01 mg FAD/ml)
- + 5 µl Nitrat-Reduktase

Inkubation bei Raumtemperatur für 20 min

- + 5 µl Pyruvat (12 mg/ml *Aqua bidest.*)
- + 5 µl Laktatdehydrogenase

Inkubation bei Raumtemperatur für 20 min

- + 100 µl Griess-Reagenz

Inkubation bei Raumtemperatur für 10 min

Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 542 nm, so dass anschließend mit Hilfe der ermittelten Standardkurve die Nitritkonzentration [µM] berechnet werden konnte.

## 2.10 Euthanasie und Organentnahme

Im Rahmen der zweiten Versuchsserie (2.15.2) erfolgte unter tiefer Isoflurannarkose (5 vol.-%) eine etwa 5 cm lange mediane Laparotomie entlang der *Linea alba* durch die zunächst Dünndarm und Milz sowie der mediane Leberlappen entnommen werden konnten. Danach wurde durch eine median durchgeführte Halsinzision mit anschließender Präparation die Trachea freigelegt. Über einen kleinen Einschnitt konnte eine Kanüle in die Trachea eingeführt und mit einer Ligatur befestigt werden. Damit die Lunge während ihrer Entnahme nicht kollabierte oder einblutete, wurde Luft aus einer luftgefüllten 5 ml Spritze über die gelegte Kanüle in die Lunge gedrückt.

Die Euthanasie erfolgte wie oben beschrieben durch die Organentnahme.

## 2.11 Makroskopische Beurteilung der Dünndarmschädigung

Der Dünndarm wurde im Rahmen der ersten Versuchsserie (2.15.1) direkt nach der Entnahme in zehn gleichgroße Segmente zerteilt, sofort in eisgekühltem Puffer (140 mM NaCl, 20 mM HEPES, pH 7,4) gelagert und von *Pylorus* nach *Caecum* (bzw. von *Duodenum* nach *Ileum*) fortlaufend durchnummeriert. Um die einzelnen Segmente makroskopisch beurteilen zu können, wurde nun von jedem Segment vorsichtig das Mesenterium mit Hilfe einer feinen Pinzette entfernt. Anschließend konnten sie an der mesenterialen Linie mit einer Knopfschere aufgeschnitten und Ingesta durch saches

Schütteln im Puffer entfernt werden. Die Darmsegmente wurden zur besseren makroskopischen Beurteilung mit der luminalen Seite nach oben auf Styroporplatten befestigt, sie befanden sich während der gesamten Zeit in eiskaltem Puffer. Die Befundung der *Mukosa* erfolgte dann basierend auf dem Schädigungsscore von Petrat *et al.*, der sich in vier Stufen einteilt (Petrat *et al.*, 2010):

- Score 0:** keine sichtbaren Veränderungen (Petechien/Hämorrhagien)
- Score 1:** geringes Auftreten von Petechien mit eventueller herdförmiger Verteilung
- Score 3:** leichte lokale Hämorrhagien ohne signifikante Verfärbung der Darmwand
- Score 9:** schwere Hämorrhagien mit dunkelroten Verfärbungen der Darmwand

Es handelte sich hier nicht um einen linear, sondern einen exponentiell (entsprechend dem Blutgehalt des Gewebes) aufgebauten Bewertungsscore (9: starke Schädigung; 3: mittlere Schädigung; 1: leichte Schädigung; 0: keine Schädigung). Zur Quantifizierung der Gesamtschädigung des Dünndarms, wurden die prozentualen Schädigungsanteile jedes einzelnen Segments gemittelt und anschließend der Mittelwert aller zehn Darmsegmente gebildet.

Im Rahmen der makroskopischen Beurteilung der Dünndarmschädigung wurde zusätzlich die äußere Darmwand aller zehn Darmsegmente begutachtet. Dabei galt es, mögliche Petechien und deren Häufigkeit und Verteilung in den einzelnen Segmenten zu dokumentieren.

## 2.12 Histologie

Die histopathologische Aufarbeitung der entnommenen Organe erfolgte im Rahmen der zweiten Versuchsserie (2.15.2), um mögliche, versuchsgruppenabhängige, Gewebeschädigungen bewerten zu können. Dazu wurden die Milz (*in toto*), der mediane Leberlappen, die Lunge (gefüllt mit 5 ml Formalin zur vollständigen Organentfaltung) und das vierte Darmsegment (2.11) in 10 %igem und neutral gepuffertem Formalin für wenigstens 24 h fixiert. Das Entwässern der Organe und das Ausgießen der Paraffinblöcke wurden am Institut für Pathologie und Neuropathologie des Universitätsklinikums Essen durchgeführt.

Mit einem Schlittenmikrotom wurden von den eingebetteten Präparaten 2-3 µm Dünnschnitte angefertigt, in einem 40 °C warmen Wasserbad entfaltet und auf beschichtete Objektträger aufgezogen.

Die anschließende maschinelle Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) erfolgte ebenfalls am Institut für Pathologie und Neuropathologie des Universitätsklinikums Essen.

Bei der Evaluierung aller histologischer Schnitte auf eine mögliche Gewebeschädigung dienten die Präparate der jeweiligen Kontrollgruppe als Referenz.

#### Dünndarm

Die histologische Beurteilung der HE-gefärbten Dünndarmschnitte des vierten Segments erfolgte unter dem Lichtmikroskop bei einer 100fachen Vergrößerung. Basierend auf dem Bewertungsscore nach Chiu und Park wurden die Präparate auf die folgenden Gewebeschädigungen untersucht (Chiu *et al.*, 1970; Park *et al.*, 1990):

- Score 0:** intakte *Mukosa*
- Score 1:** kapilläre Kongestion, sowie subepithelialer Grünhagen-Raum
- Score 2:** subepitheliale Räume sind ausgedehnt und es findet eine leichte Ablösung des Epithels statt
- Score 3:** starke Ablösung des Epithels der Villi (vereinzelte freiliegende Spitzen)
- Score 4:** komplett freiliegende, epithellose Villi
- Score 5:** Hämorrhagien und zerstörte Villi
- Score 6:** Hämorrhagien und beschädigte Krypten
- Score 7:** Hämorrhagien, sowie nekrotische *Mukosa* und *Submukosa*
- Score 8:** Hämorrhagien und transmurale Nekrose

Im Rahmen der histopathologischen Beurteilung der Dünndarmschädigung wurde zusätzlich die Außenseite der Darmwand begutachtet. Dabei galt es mögliche durch die versuchsgruppenabhängigen Infusionen und Versuchszeiten verursachte Gewebeschädigungen zu dokumentieren. Die Beurteilung erfolgte ebenfalls lichtmikroskopisch (10, 40 und 100fache Vergrößerung).

#### Milz

Mit einem Lichtmikroskop wurden die HE-gefärbten Schnitte der Milz bei einer 10fachen bzw. 40fachen Vergrößerung auf mögliche, versuchsabhängige, Gewebeschädigungen



untersucht. Dabei lag das Augenmerk vor allem auf der Beurteilung der Intaktheit von weißer und roter Pulpa.

#### Lunge

Die HE-gefärbten Schnitte der Lunge wurden lichtmikroskopisch (10 und 40fache Vergrößerung) auf, durch Einblutungen oder Wassereinträge hervorgerufene, Schwellungen der Alveolarwand untersucht. Mit Hilfe der AxioVision Rel.4.6 Software wurden dazu repräsentative Aufnahmen ausgewählt und die Alveolarwände vermessen.

#### Leber

Im Rahmen der histopathologischen Beurteilung der Leber wurde ebenfalls die Intaktheit des gesamten Organs begutachtet (Lichtmikroskop, 10 und 40fache Vergrößerung) und dokumentiert.

### 2.13 Rotationsthrombelastometrie

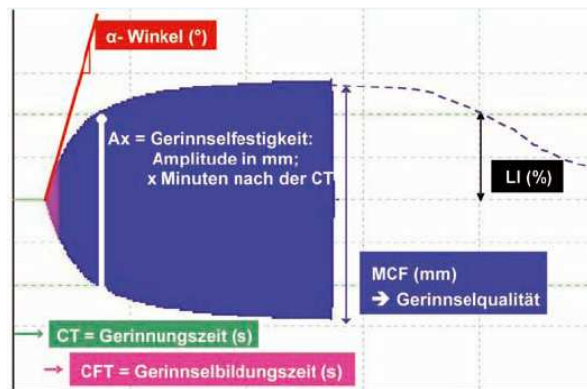
Die Analyse der viskoelastischen Eigenschaften des Blutes, als Maß für eine eventuell aufgetretene Gerinnungsstörung, erfolgte mit einem ROTEM® Vollblut-Hämostase-System im Rahmen der zweiten Versuchsserie (2.15.2). Das Analysegerät wurde freundlicherweise von Dr. Klaus Görlinger, dem klinischen Direktor von TEM International, zur Verfügung gestellt.

Die Rotationsthrombelastometrie ist eine Weiterentwicklung der Thrombelastographie nach Hartert und beruht auf der Fähigkeit des gerinnenden Blutes die alternierenden Bewegungen eines Stempels zu verringern (Kehrel 2011). Zu definierten Zeitpunkten (Abb.6 und 7) wurden mit einer 1 ml Spritze (enthält bereits 30 µl Tri-Natrium-Citrat) über den arteriellen Katheter 270 µl Blut abgenommen. Für die Messung wurden 20 µl Recalcifizierungsreagenz in einer Küvette vorgelegt und 200 µl des Citratblutes zugegeben. Nach gründlicher Durchmischung wurde die Küvette auf den bereits fixierten Stempel geschoben und die Messung gestartet (dabei lagen zu keinem Zeitpunkt mehr als zehn Sekunden zwischen der Zugabe des Citratblutes und der beginnenden Analyse). Das Analysengerät bestimmte die folgenden thrombelastometrischen Parameter:

Die *clotting time* (auch *coagulation time*; CT) ist die Zeit, die nach der Zugabe des Aktivators vergeht, bis sich erste Fibrinfäden (beginnende Gerinnselbildung) bilden. Sie entspricht der Aktivierungszeit zur Thrombingeneration. Damit eine Aussage über die Geschwindigkeit der Clotbildung getroffen werden konnte, wurde die *clot formation time* (CFT) bestimmt. Sie definiert die Phase vom Beginn der Gerinnselbildung bis zum

Erreichen einer Amplitude von 20 mm. Ein Indikator für die Clotfestigkeit und damit ein Maß für die Tendenz einer Blutungsneigung ist die *maximum clot firmness* (MCF). Eine Abnahme der Amplitude aufgrund einer möglichen Lyse beschreibt der Lyse-Index, der zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt werden kann. Die Messung beschränkte sich auf den Lyse-Index nach 60 min (LI60). Der Winkel  $\alpha$  gilt als Maß für die Steilheit des Kurvenanstiegs (Lang und Depka 2006; Lang 2011).

Eine exemplarische Darstellung der beschriebenen Parameter zeigt Abbildung 4.



**Abbildung 4:** Darstellung der mit dem Vollblut-Hämostase-System untersuchten thrombelastometrischen Parameter (Fries 2011). Charakterisiert sind die Messparameter CT (*coagulation time*): Aktivierungszeit der Thrombingeneration; CFT (*clot formation time*): Geschwindigkeit der Gerinnselformierung; MCF (*maximum clot firmness*): Indikator für die Clotfestigkeit;  $\alpha$ -Winkel: Steilheit des Kurvenanstiegs und Lyse-Index (LI): Indikator für eine Lyse.

## 2.14 Bestimmung der soliden (PEG-PLGA) bzw. mit Perfluordekalin-gefüllten (PEG-PLGA+PFD) Mikrokapselanzahl mit dem Laser-Scanning-Mikroskop

Schwerpunkt der in 2.15.1 beschriebenen ersten Versuchsserie war die Bestimmung der intravasalen Halbwertszeit der Mikrokapseln. Um die Mikrokapselanzahl der intravenös infundierten soliden bzw. mit PFD-gefüllten Mikrokapseln und damit deren Halbwertszeit zu bestimmen, wurde ein Laser-Scanning-Mikroskop (ausgestattet mit Helium/Neon- und Argon-Laser) verwendet.

Dazu wurden die Mikrokapseln mittels Zentrifugation aus den im Versuchsverlauf entnommenen Blutproben isoliert und retrospektiv *in vitro* mit Fluorescein-Isothiocyanat-Dextran 150000 (66,66  $\mu$ M) bei 20 °C und über Nacht angefärbt. Je Probe wurden fünf Gesichtsfelder mittels CEEXO 2006 CellExplorer Software ausgewertet. Aus den daraus errechneten Mittelwerten ermittelte sich die Kapselanzahl zu dem jeweiligen Zeitpunkt der Blutentnahme.

## 2.15 Versuchsserien und Gruppen

Um das Verhalten und die Effekte der verschiedenen Kapselsysteme *in vivo* zu untersuchen, wurde ein Rattenmodell ausgewählt, indem keine zusätzlichen körperlichen Beeinträchtigungen vorlagen oder während des Versuchs hinzugefügt wurden. An narkotisierten Tieren erfolgte eine intravenöse Injektion mit definiertem Infusionsvolumen (10 ml/kg KGW) mittels einer Spritzenpumpe über einen Zeitraum von 60 bzw. 30 min. Die fortlaufende Dokumentation systemischer Parameter wie dem MAP, der Herz- und Atemfrequenz sowie der Körpertemperatur ermöglichte eine lückenlose Überwachung des Versuchstieres. Diese Parameter, gepaart mit den laborparametrischen Blut- und Plasmauntersuchungen, sowie der histologischen Aufarbeitung der final entnommenen Organe erlaubten eine umfangreiche Analyse der Einflüsse der verschiedenen Kapselsysteme auf das Tier.

Aufbauend auf die erste Versuchsserie, die die Bestimmung der intravasalen Kapselhalbwertszeit zum Ziel hatte (2.15.1), folgte eine weitere konsekutive Versuchsserie, in der Ursache und Entstehungsort der in der ersten Serie beobachteten Schädigungen ermittelt werden sollten (2.15.2).

Aufgrund der in der ersten und zweiten Serie evaluierten Daten wurde eine weiterführende Evaluierungsreihe zur näheren Untersuchung der durch Infusion PFD-gefüllter PEG-PLGA-Mikrokapseln bedingten, initialen Hypotension durchgeführt (2.15.3).

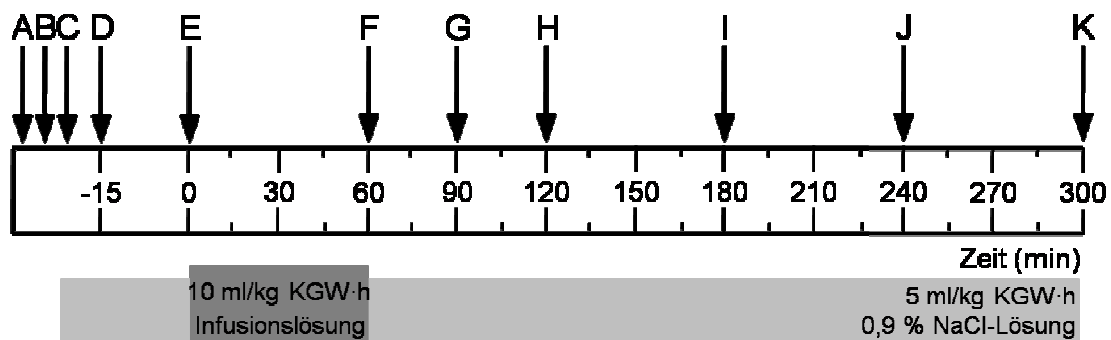
### 2.15.1 Versuchsserie zur Bestimmung der intravasalen Halbwertszeit von soliden (PEG-PLGA) bzw. mit Perfluordekalin-gefüllten (PEG-PLGA+PFD) Mikrokapseln (Serie 1)

Tabelle 5 zeigt die zur Bestimmung der intravasalen Halbwertszeit eingesetzten Versuchsgruppen der ersten Serie. Die Größe der Gruppen lag für die Kontrolle (NaCl-Kontrolle) bei 3 Tieren, in der Gruppe der soliden Mikrokapseln (PEG-PLGA) bei 6 Tieren und für die Gruppe der mit PFD-gefüllten Mikrokapseln (PEG-PLGA+PFD) wurden ebenfalls 6 Tiere verwendet. Aufgrund des höheren Gewichts von PFD-gefüllten gegenüber soliden Mikrokapseln, wurde mittels Hämatokritzentrifuge ein Volumenanteil der Kapselsuspensionen von  $9 \pm 1$  vol.-% eingestellt. Dies entsprach einer Kapselkonzentration von  $83,7 \pm 16,8$  mg/ml (PEG-PLGA) bzw.  $117,8 \pm 17,3$  mg/ml (PEG-PLGA+PFD).

**Tabelle 5: Darstellung der Versuchsgruppen der ersten Serie zur Bestimmung der intravasalen Halbwertszeit.**

Serie 1			
Gruppe	Kapselkonzentration	Versuchsdauer	Anzahl Tiere
NaCl-Kontrolle	keine	300 min	3
PEG-PLGA	9 ± 1 vol.-%		6
PEG-PLGA+PFD	9 ± 1 vol.-%		6

Die Kapseln wurden wie in 2.4 beschrieben synthetisiert, waren in steriler 0,9 % NaCl-Lösung dispergiert und wurden über die *Vena femoralis* mit 10 ml/kg KGW·h und mit Hilfe einer Spritzenpumpe infundiert. Die Charakterisierung des Versuchsablaufes beschreibt Abbildung 5.



**Abbildung 5: Zeitlicher Ablauf der ersten Versuchsserie zur Bestimmung der intravasalen Halbwertszeit.** Gezeigt ist der zeitliche Ablauf der ersten Versuchsserie beginnend 15 min vor dem Start der Applikation der versuchsgruppenabhängigen Infusionslösung bis 300 min danach. A: Narkoseeinleitung, Katheterisierung der *A. femoralis*; B: Beginn des Biomonitoring, 1. Blutentnahme; C: Katheterisierung der *V. femoralis*; D: Beginn der Akklimationsphase; E: Start der *i.v.* Infusion (Infusionslösung abhängig von der Versuchsgruppe); F: Infusionsende, 2. Blutentnahme; G: 3. Blutentnahme; H: 4. Blutentnahme; I: 5. Blutentnahme; J: 6. Blutentnahme; K: Versuchsende (finale Blutentnahme, Organentnahme).

Nach der Infusion der jeweiligen Versuchsgruppe wurde der venöse Katheter mit je 1 ml 0,9 % NaCl-Lösung gespült, um sicherzustellen, dass das gesamte Volumen infundiert wurde. Zu den dargestellten definierten Zeitpunkten wurde den Tieren Blut für laborparametrische Untersuchungen (Blutgasanalyse, Plasmaenzymkonzentrationen, freies Plasmahämoglobin) und die Kapselzahlbestimmung entnommen. Am Ende des Versuches erfolgten eine finale Blutentnahme zur Bestimmung der oben genannten Parameter sowie die Entnahme des Dünndarms zur makroskopischen Befundung.

### 2.15.2 Versuchsserie zur Bestimmung der toxikologischen Auswirkungen der Infusion von Polyvinylalkohol (PVA) bzw. mit Perfluordekalin-gefüllten (PEG-PLGA+PFD) Mikrokapseln (Serie 2)

Tabelle 6 zeigt die Versuchsgruppen zur Toxizitätsbestimmung der zweiten Serie. Um den Zeitpunkt einer eintretenden Schädigung und/oder Immunantwort eingrenzen zu können, wurden in der zweiten Serie drei Zeitpunkte für das Versuchsende definiert. Für die Evaluierung der gewonnenen Daten bedeutete dies, dass die Dokumentation der Vitalparameter, Blutgasanalyse, Gerinnungsparameter und Plasmaenzymaktivitäten fortlaufend über die Zeit erfolgte. Dahingegen wurden für die Nitritkonzentration, Komplementfaktoren und Zytokine aufgrund des hohen benötigten Probenvolumens lediglich die finalen Werte (90, 150 und 270 min nach Infusionsstart) gemessen und tabellarisch bzw. als Säulendiagramme dargestellt (3.2).

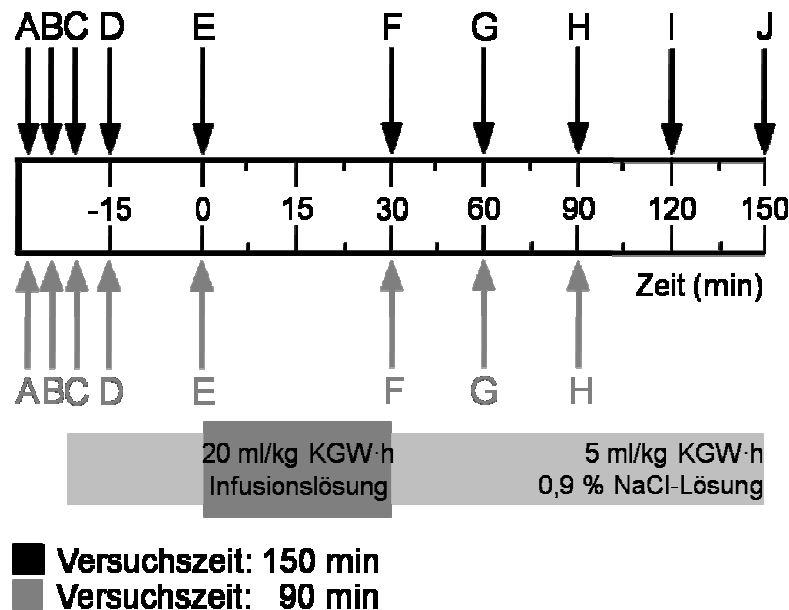
Außerdem wurde eine kapselfreie Polyvinylalkohollösung (PVA, 2,5 mg/ml) als eigenständige Gruppe in die zweite Versuchsserie integriert, um den zur Mikrokapselsynthese eingesetzten Emulgator als Ursache für die Schädigungen ausschließen zu können.

Die Anzahl der Tiere lag zu allen Endzeitpunkten sowohl in der Kontrollgruppe (NaCl-Kontrolle) als auch in der PVA-Versuchsgruppe bei 3 Tieren. In der Gruppe der mit PFD-gefüllten Mikrokapseln (PEG-PLGA+PFD) wurden je 4 Tiere bei einer Gesamtversuchsdauer von 90 und 150 min und 6 Tiere in einem Versuchszeitraum von 270 min eingesetzt. Damit die Daten zur Toxizitätsbestimmung mit den Ergebnissen der ersten Serie vergleichbar waren, wurde mittels Hämatokritzentrifuge erneut ein Volumenanteil der Kapselsuspension von  $9 \pm 1$  vol.-% eingestellt. Dies entsprach einer Kapselkonzentration von  $124,7 \pm 13,9$  mg/ml PEG-PLGA+PFD.

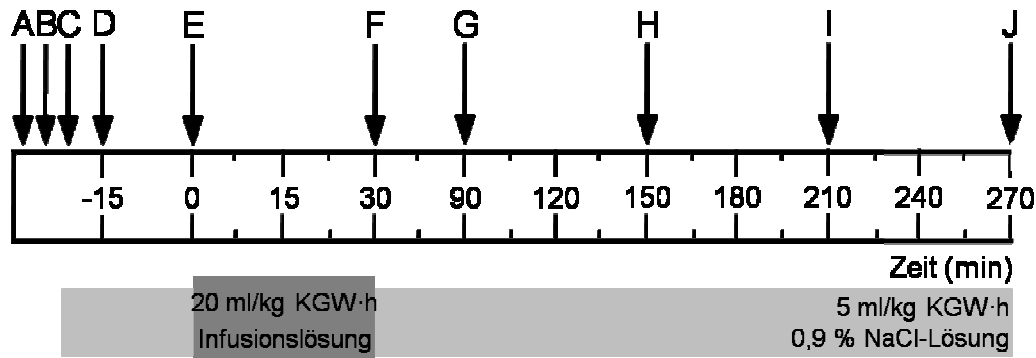
**Tabelle 6: Darstellung der Versuchsgruppen in der zweiten Serie.**

Serie 2			
Gruppe	Kapselkonzentration	Versuchsdauer	Anzahl Tiere
NaCl-Kontrolle	keine	90 min	3
	keine	150 min	3
	keine	270 min	3
PVA	keine	90 min	3
	keine	150 min	3
	keine	270 min	3
PEG-PLGA+PFD	$9 \pm 1$ vol.-%	90 min	4
	$9 \pm 1$ vol.-%	150 min	4
	$9 \pm 1$ vol.-%	270 min	6

Die Kapseln wurden wie in 2.4 beschrieben synthetisiert und waren in steriler 0,9 % NaCl-Lösung dispergiert. Der PVA (2,5 mg/ml) wurde in 0,9 % NaCl-Lösung gelöst und anschließend steriltfiltriert. Über die *Vena femoralis* wurden die versuchsgruppenabhängigen Infusionslösungen mit 20 ml/kg KGW·h und mit Hilfe einer Spritzenpumpe über 30 min infundiert. Die genauen Versuchsabläufe beschreiben Abbildung 6 und Abbildung 7.



**Abbildung 6: Zeitlicher Ablauf der zweiten Versuchsserie für einen Versuchszeitraum von 90 min und 150 min.** Gezeigt ist der zeitliche Ablauf der zweiten Versuchsserie beginnend 15 min vor dem Start der Applikation der versuchsgruppenabhängigen Infusionslösung bis 90 bzw. 150 min danach. A: Narkoseeinleitung, Katheterisierung der A. *femoralis*; B: Beginn des Biomonitoring, 1. Blutentnahme; C: Katheterisierung der V. *femoralis*; D: Beginn der Akklimatisierungsphase; E: Start der i.v. Infusion (Infusionslösung abhängig von der Versuchsgruppe); F: Infusionsende; G: 2. Blutentnahme; H: 3. Blutentnahme (Versuchszeit:150 min) bzw. Versuchsende (finale Blutentnahme, Organentnahme; Versuchszeit: 90 min); I: 4. Blutentnahme (Versuchszeit:150 min); J: Versuchsende (finale Blutentnahme, Organentnahme; Versuchszeit: 150 min).



**Abbildung 7: Zeitlicher Ablauf der zweiten Versuchsserie für einen Versuchszeitraum von 270 min.** Gezeigt ist der zeitliche Ablauf der zweiten Versuchsserie beginnend 15 min vor dem Start der Applikation der versuchsgruppenabhängigen Infusionslösung bis 270 min danach. A: Narkoseeinleitung, Katheterisierung der *A. femoralis*; B: Beginn des Biomonitoring, 1. Blutentnahme; C: Katheterisierung der *V. femoralis*; D: Beginn der Akklimatisierungsphase; E: Start der *i.v.* Infusion (Infusionslösung abhängig von der Versuchsgruppe); F: Infusionsende; G: 2. Blutentnahme; H: 3. Blutentnahme; I: 4. Blutentnahme; J: Versuchsende (finale Blutentnahme, Organentnahme).

Nach der Infusion der jeweiligen Versuchsgruppe wurde der venöse Katheter mit je 1 ml 0,9 % NaCl-Lösung gespült, um sicherzustellen, dass das gesamte Volumen der jeweiligen Versuchsgruppe infundiert wurde. Zu den in Abbildung 6 und 7 dargestellten definierten Zeitpunkten wurde den Tieren Blut für laborparametrische Untersuchungen (Blutgasanalyse, Plasmaenzymkonzentrationen, Thrombelastometrie) entnommen. Am Ende des Versuches erfolgten finale Blutentnahmen (zur Bestimmung oben genannter Parameter, als auch Nitritgehalt, Komplement- und Zytokinbestimmung) sowie die Entnahme der Organe (Leber, Lunge, Milz und Dünndarm) für die histopathologische Aufarbeitung.

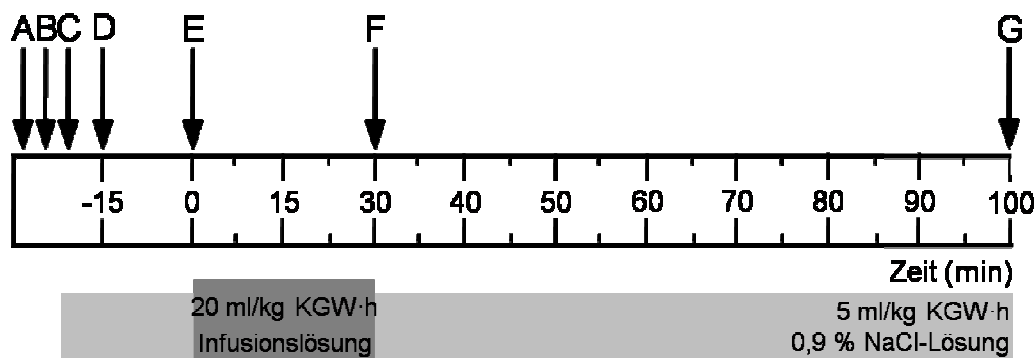
### 2.15.3 Versuchsserie zum Einfluss von N<sub>ω</sub>-Nitro-L-argininmethylester und Phenylephrin auf die Hypotension während einer PEG-PLGA+PFD-Mikrokapselinfusion (Evaluierungsreihe)

In der konsekutiv durchgeführten Evaluierungsreihe zum episodischen Abfall des MAP während einer Infusion von PEG-PLGA+PFD-Mikrokapseln wurden zwei Versuchsgruppen mit jeweils n=3 Tieren definiert (Gruppen 1 und 2). Damit die resultierenden Daten mit denen der ersten beiden Versuchsserien vergleichbar waren, wurde mittels Hämatokritzentrifuge erneut ein Volumenanteil der Kapselsuspension von  $9 \pm 1$  vol.-% eingestellt. Dies entsprach einer Kapselkonzentration von

143,8 ± 20,14 mg/ml PEG-PLGA+PFD. Die Kapseln wurden wie in 2.4 beschrieben synthetisiert und waren in steriler 0,9 % NaCl-Lösung dispergiert. Über die *Vena femoralis* wurde die Mikrokapsel-suspension mit 20 ml/kg KGW·h und mit Hilfe einer Spritzenpumpe über 30 min infundiert. Nach der Infusion wurde der venöse Katheter mit 1 ml 0,9 % NaCl-Lösung gespült, um sicherzustellen, dass das gesamte Volumen der Mikrokapselsuspension infundiert worden war. Die genauen Versuchsabläufe beschreiben die Abbildungen 8 und 9.

### Gruppe 1

Das Sympathomimetikum Phenylephrin wirkt als Agonist am  $\alpha_1$ -Adrenozeptor als lokaler Vasokonstriktor/Vasopressor. Daher wurde in der ersten Gruppe der Evaluierungsreihe untersucht, ob Phenylephrin (3 µg/kg KGW·min) als zusätzlicher Bestandteil der PEG-PLGA+PFD-Mikrokapselinfusion die initial und episodisch auftretende Hypotension inhibieren kann.



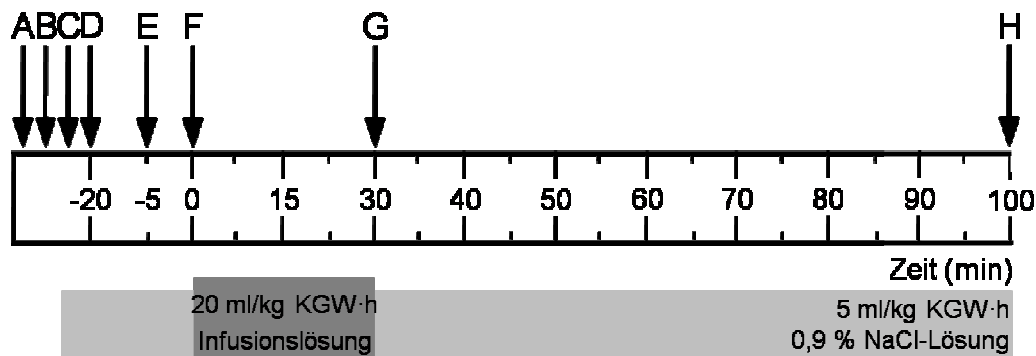
**Abbildung 8: Zeitlicher Ablauf des Versuchsmodells zum Einfluss von Phenylephrin auf die temporär auftretende Hypotension für einen Versuchszeitraum von 100 min.** Gezeigt ist der zeitliche Ablauf der zweiten Versuchsserie beginnend 15 min vor dem Start der Applikation der PEG-PLGA+PFD-Infusionslösung (inklusive 3 µg/kg KGW·min Phenylephrin) bis 100 min danach. A: Narkoseeinleitung, Katheterisierung der *A. femoralis*; B: Beginn des Biomonitoring; C: Katheterisierung der *V. femoralis*; D: Beginn der Akklimatisierungsphase; E: Start der *i.v.* Infusion; F: Infusionsende; G: Versuchsende (Euthanasie).

### Gruppe 2

Das Nitroderivat der Aminosäure Arginin, N<sub>ω</sub>-Nitro-L-argininmethylester als Hydrochlorid (L-NAME), inhibiert die Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) die die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) katalysiert. Ausgehend von diesem Sachverhalt wurde in der zweiten Gruppe der Evaluierungsreihe untersucht, welche Auswirkungen eine der PEG-PLGA+PFD-Mikrokapselinfusion vorangehende Applikation von L-NAME hat. Hierzu



wurden 5 min vor Start der Mikrokapselinfusion 4 mg/kg KGW L-NAME in 0,9 % NaCl als Bolus (100 µl) appliziert.



**Abbildung 9: Zeitlicher Ablauf des Versuchsmodells zum Einfluss von N<sub>ω</sub>-Nitro-L-argininmethylester als Hydrochlorid (L-NAME) auf die temporär auftretende Hypotension für einen Versuchszeitraum von 100 min.** Gezeigt ist der zeitliche Ablauf der zweiten Versuchsserie beginnend 20 min vor dem Start der Applikation der PEG-PLGA+PFD-Infusionslösung bis 100 min danach. A: Narkoseeinleitung, Katheterisierung der *A. femoralis*; B: Beginn des Biomonitoring; C: Katheterisierung der *V. femoralis*; D: Beginn der Akklimatisierungsphase; E: Applikation (*i.v.*) von 4 mg/kg KGW L-NAME; F: Start der *i.v.* Infusion; G: Infusionsende; H: Versuchsende (Euthanasie).

## 2.16 Statistik

Die dargestellten Daten sind Mittelwerte der jeweiligen Versuchsgruppe  $\pm$  Standardfehler (Standard Error of the Mean, SEM). Alle statistischen Untersuchungen wurden mit dem Programm XLstat 2010 durchgeführt. Für die Ermittlung des Signifikanzniveaus der Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen, wurde eine one-way ANOVA für nichtwiederkehrende oder für wiederholte Messwerte mit nachfolgender Fisher-LSD posthoc-Analyse angewendet. Ein  $p$ -Wert von 0,05 galt hier als statistisch signifikant (\* bzw. #).

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1 Bestimmung der intravasalen Halbwertszeit von soliden (PEG-PLGA) bzw. mit Perfluordekalin-gefüllten (PEG-PLGA+PFD) Mikrokapseln (Serie 1)

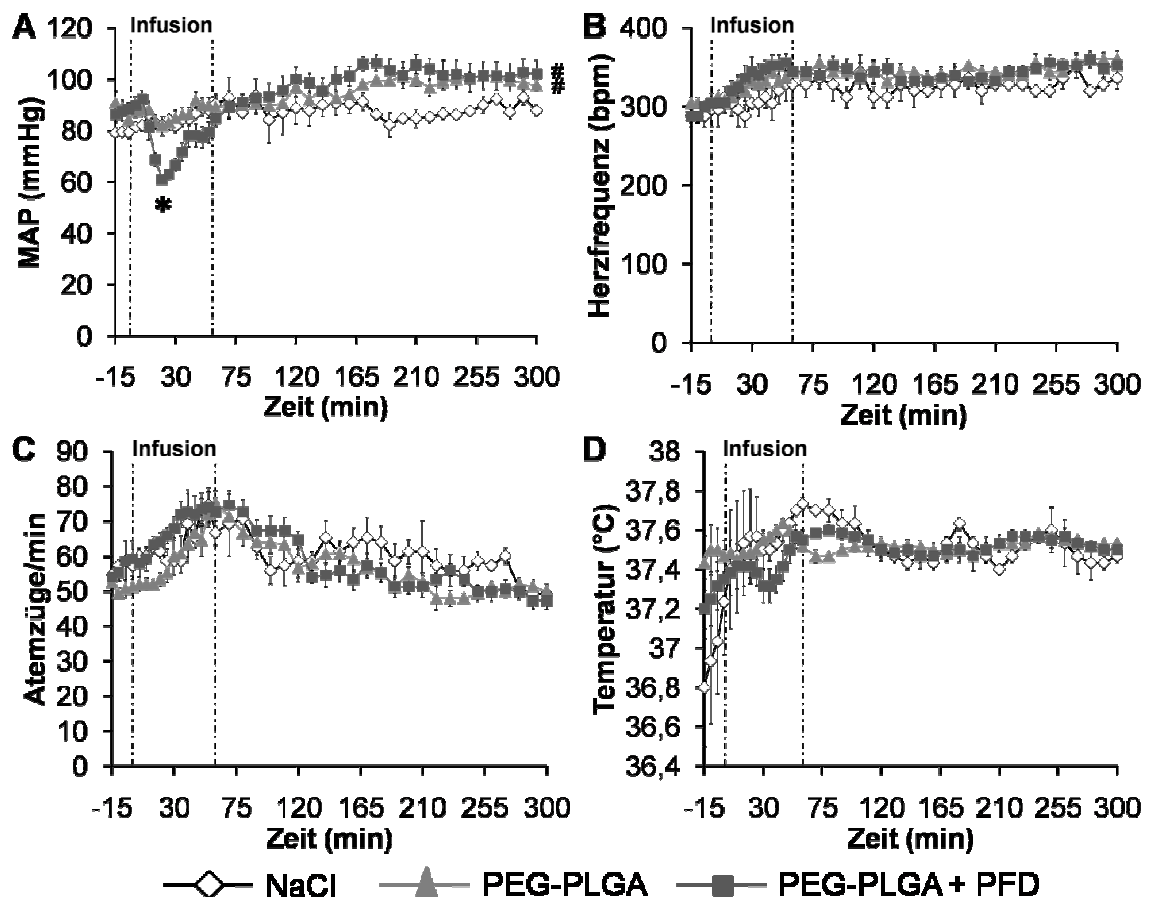
Bei der Auswertung der ersten Versuchsserie zur Bioverträglichkeit und der Bestimmung der intravasalen Halbwertszeit von soliden (PEG-PLGA) und PFD-gefüllten (PEG-PLGA+PFD) Mikrokapseln zeigten sich zum Teil signifikante Unterschiede der Messparameter der mit Mikrokapseln behandelten Tiere im Vergleich mit der NaCl-Kontrolle.

Tiere, die eine Infusion der PEG-PLGA+PFD-Mikrokapseln erhielten, zeigten neben einem signifikanten temporären Abfall des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP) innerhalb der Infusionsphase auch einen episodischen Anstieg der Glukose- und Laktatkonzentrationen direkt nach Infusion. Der *Base Excess* (BE) dieser und der mit PEG-PLGA-Mikrokapseln behandelten Tiere war im Vergleich zur NaCl-Kontrolle signifikant erniedrigt. Die Plasmaenzymaktivitäten stiegen final in beiden Mikrokapselversuchsgruppen signifikant über die Werte der NaCl-Kontrolle, wobei der Anstieg in der PEG-PLGA+PFD-Versuchsgruppe am deutlichsten verlief. Während die makroskopische Beurteilung der inneren Darmwand keine pathologischen Auffälligkeiten ergab, waren in der äußeren Darmwand vereinzelte Petechien zu erkennen, die vor allem im vierten Darmsegment lokalisiert waren.

Die intravasale Halbwertszeit der mit PFD-gefüllten Mikrokapseln ( $t_{1/2} = 55$  min) war gegenüber der Halbwertszeit der soliden Mikrokapseln ( $t_{1/2} = 42,5$  min) um etwa 13 min verlängert.

### 3.1.1 Einfluss von *i.v.* applizierten soliden (PEG-PLGA) bzw. mit Perfluordekalin-gefüllten (PEG-PLGA+PFD) Mikrokapseln auf die Vitalparameter der Ratte

Bei der Auswertung der Versuchsserie zur Bioverträglichkeit von PEG-PLGA- und PEG-PLGA+PFD-Mikrokapseln zeigten sich bei den Vitalparametern, mit Ausnahme des MAPs, keine ausgeprägten Veränderungen (Abb.10).



**Abbildung 10: Einfluss der verschiedenen Mikrokapseltypen nach *i.v.* Applikation auf die Vitalparameter der Ratte.** Die narkotisierten und analgesiierten Tiere erhielten über eine 60-minütige Infusionsphase 10 ml/kg KGW·h solide bzw. PFD-gefüllte PEG-PLGA-Mikrokapseln. Tiere der Kontrollgruppe (NaCl) wurden mit dem gleichen Volumen isotoner 0,9 %iger Kochsalzlösung infundiert. Dargestellt sind (A) der MAP, (B) die Herzfrequenz, (C) die Atemfrequenz und (D) die Körpertemperatur. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n=3$  (NaCl),  $n=6$  (PEG-PLGA),  $n=6$  (PEG-PLGA+PFD). Nicht sichtbare SEM-Werte sind durch die Symbole verdeckt. \* $p < 0,05$  (PEG-PLGA+PFD vs. NaCl-Kontrolle während der Infusion); # $p < 0,05$  (PEG-PLGA bzw. PEG-PLGA+PFD vs. NaCl-Kontrolle nach der Infusion).

Der MAP in der NaCl-Kontrollgruppe blieb während des gesamten Versuchszeitraumes konstant zwischen  $79 \pm 1$  mmHg und  $92 \pm 2$  mmHg (Abb.10A). Ähnlich verhielt es sich in

der Gruppe der mit PEG-PLGA-Mikrokapseln infundierten Tiere. Der MAP befand sich hier weitgehend zwischen  $82 \pm 4$  mmHg und  $102 \pm 2$  mmHg und damit im Bereich der NaCl-Kontrollgruppe. Bei den Tieren, die eine Infusion von PEG-PLGA+PFD-Mikrokapseln erhielten, fiel der MAP kurz nach Beginn der Infusionsphase von  $90 \pm 3$  mmHg signifikant auf ein Minimum von  $61 \pm 2$  mmHg ab. Anschließend stieg der MAP langsam aber beständig an, um nach 60 min wieder das Level der NaCl-Kontrollgruppe ( $90 \pm 4$  mmHg) zu erreichen. Im weiteren Versuchsverlauf, d.h. innerhalb der vierstündigen Beobachtungsphase, blieb der MAP weitgehend konstant zwischen  $85 \pm 3$  mmHg und  $106 \pm 3$  mmHg. Am Versuchsende, 300 min nach dem Start der Infusion, lag der MAP der drei Versuchsgruppen in einem Bereich zwischen  $88 \pm 2$  mmHg (NaCl),  $98 \pm 2$  mmHg (PEG-PLGA) und  $102 \pm 5$  mmHg (PEG-PLGA+PFD).

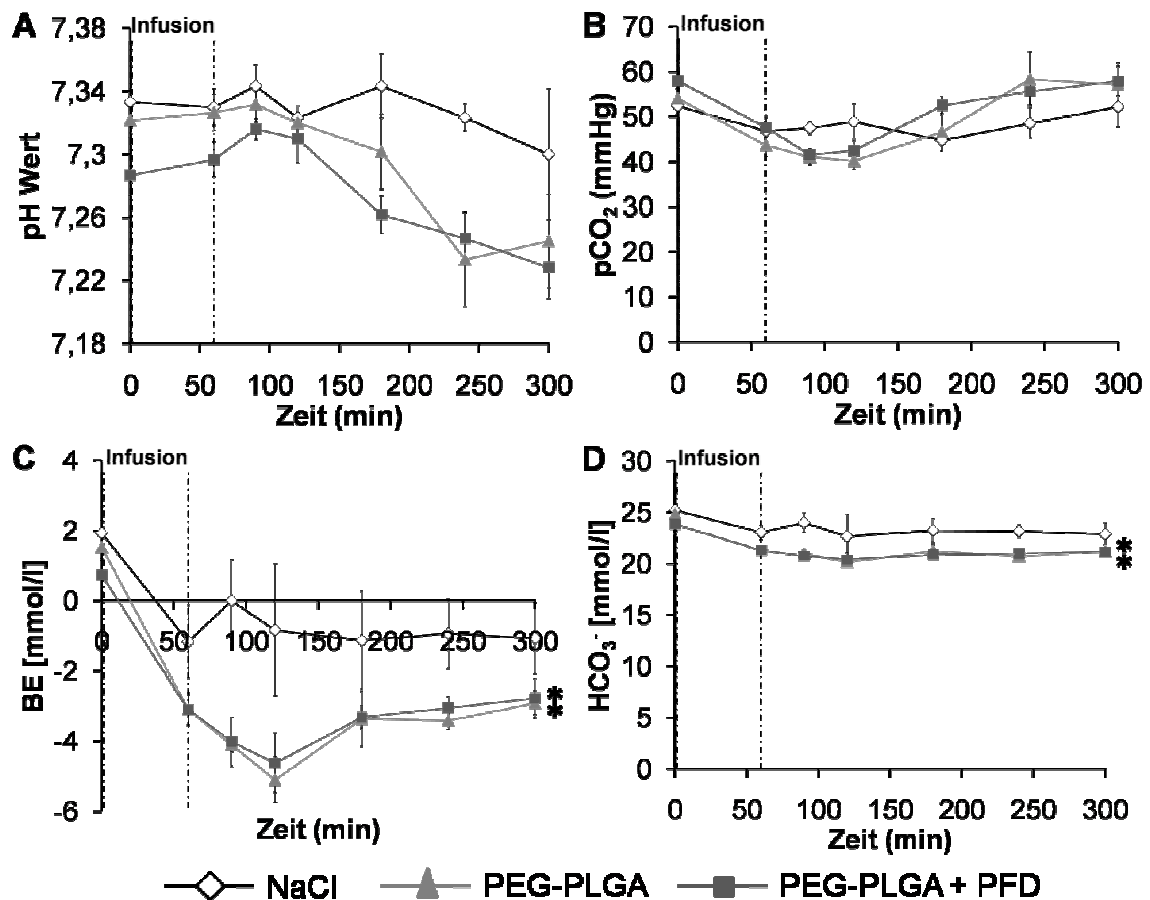
Die Herzfrequenz erhöhte sich sowohl in der NaCl-Kontrollgruppe als auch bei den mit Mikrokapseln infundierten Tieren während der Infusionsphase (Abb.10B). So stieg sie während der Infusion von  $288 \pm 14$  Schlägen/min auf  $328 \pm 21$  Schlägen/min in der NaCl-Kontrollgruppe, von  $304 \pm 8$  Schlägen/min auf  $344 \pm 12$  Schlägen/min in der PEG-PLGA-Gruppe und von  $288 \pm 9$  Schlägen/min auf  $344 \pm 12$  Schlägen/min in der PEG-PLGA+PFD-Gruppe an. Anschließend blieb die Herzfrequenz in allen drei Versuchsgruppen konstant bei rund 340 Schlägen/min.

Die Atemfrequenz der Tiere stieg zu Beginn der Infusion von  $57 \pm 1$  auf  $67 \pm 4$  Atemzüge/min (NaCl) bzw. von  $51 \pm 2$  auf  $75 \pm 3$  Atemzüge/min (PEG-PLGA) bzw. von  $59 \pm 5$  auf  $73 \pm 4$  Atemzüge/min (PEG-PLGA+PFD) leicht an (Abb.10C). Im Anschluss während der vierstündigen Beobachtungsphase sank die Atemfrequenz in allen drei Versuchsgruppen auf rund 50 Atemzüge/min.

Die Körpertemperatur der Versuchstiere unterlag den typischen Schwankungen um  $37^\circ\text{C}$ , veränderte sich aber zu keinem Zeitpunkt und in keiner der drei Versuchsgruppen wesentlich (Abb.10D).

### 3.1.2 Einfluss von i.v. applizierten soliden (PEG-PLGA) bzw. mit Perfluordekalin-gefüllten (PEG-PLGA+PFD) Mikrokapseln auf Parameter der Blutgasanalyse, metabolische Parameter sowie Elektrolyte

Die Darstellung des Einflusses von PEG-PLGA- und PEG-PLGA+PFD-Mikrokapseln auf die Blutgase sowie metabolische Parameter legte zum Teil signifikante Unterschiede im Vergleich zur NaCl-Kontrolle offen (Abb.11, 12 und Tab.7).

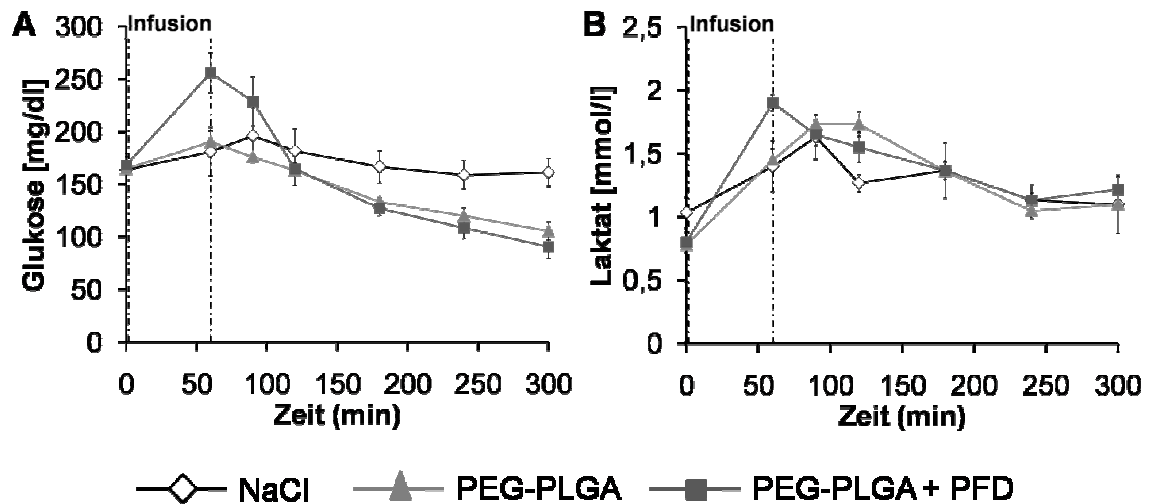


**Abbildung 11: Einfluss der verschiedenen Mikrokapseltypen nach i.v. Applikation auf die Parameter der Blutgasanalyse.** Die narkotisierten und analgesiierten Tiere erhielten über eine 60-minütige Infusionsphase 10 ml/kg KGW·h solide (PEG-PLGA) bzw. PFD-gefüllte (PEG-PLGA+PFD) Mikrokapseln. Tiere der Kontrollgruppe (NaCl) wurden mit dem gleichen Volumen isotoner 0,9 %iger Kochsalzlösung infundiert. Alle Parameter wurden unverzüglich nach Abnahme aus heparinisiertem, arteriellem Vollblut bestimmt. Dargestellt sind (A) pH-Wert, (B) Kohlenstoffdioxidpartialdruck (pCO<sub>2</sub>), (C) Base Excess (BE) und (D) Standardbicarbonatkonzentration (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Die gezeigten Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM, n=3 (NaCl), n=6 (PEG-PLGA), n=6 (PEG-PLGA+PFD). Nicht sichtbare SEM-Werte sind durch die Symbole verdeckt. \*p < 0,05 (PEG-PLGA bzw. PEG-PLGA+PFD vs. NaCl-Kontrolle während des gesamten Versuchszeitraumes).

Der pH-Wert aller drei Versuchsgruppen blieb während der 60-minütigen intravenösen Applikationsphase nahezu konstant (Abb.11A). Dabei lag der pH-Wert der mit NaCl infundierten Tiere innerhalb des gesamten Versuchszeitraumes nahezu konstant zwischen  $7,32 \pm 0,01$  und  $7,34 \pm 0,02$ . In den Versuchen der mit PEG-PLGA- und PEG-PLGA+PFD-Mikrokapseln behandelten Tiere sank der pH-Wert ab 120 min nach dem Start der Infusion bis zum Versuchsende nach 300 min von  $7,32 \pm 0,01$  auf  $7,25 \pm 0,03$  (PEG-PLGA) bzw. von  $7,31 \pm 0,02$  auf  $7,23 \pm 0,02$  (PEG-PLGA+PFD).

Der Kohlenstoffdioxidpartialdruck ( $pCO_2$ ) blieb für die Kontrollgruppe innerhalb des gesamten Versuchszeitraumes konstant bei etwa 48 mmHg (Abb.11B). Die Tiere der beiden Mikrokapselversuchsgruppen zeigten neben etwas niedrigeren Ausgangswerten bis 120 min nach dem Start der Infusion einen gegenüber der Kontrollgruppe leicht abfallenden  $pCO_2$  (PEG-PLGA:  $40,3 \pm 2$  mmHg; PEG-PLGA+PFD:  $42,5 \pm 2$  mmHg). Im weiteren Verlauf stiegen die Werte der Tiere aus diesen beiden Gruppen bis zum Versuchsende leicht über das Niveau der Kontrollgruppe auf einen mittleren Wert von  $57,1 \pm 5$  mmHg (PEG-PLGA) bzw.  $58,0 \pm 3$  mmHg (PEG-PLGA+PFD) an. Im Gegensatz dazu verblieb der Sauerstoffpartialdruck ( $pO_2$ ) sowohl für diejenigen Tiere, die mit soliden als auch mit PFD-gefüllten PEG-PLGA-Mikrokapseln infundiert wurden, während des gesamten Versuchszeitraumes leicht über dem Niveau der Kontrollgruppe (Tab.7).

Der *Base Excess* (BE, Abb.11C) fiel bei den Tieren der Kontrollgruppe von initial  $1,9 \pm 0,7$  mmol/l auf  $-1,1 \pm 1,0$  mmol/l am Versuchsende nach 300 min. Der BE der mit PEG-PLGA- und PEG-PLGA+PFD-Mikrokapseln infundierten Tiere lag, unter Berücksichtigung des gesamten Versuchszeitraumes, signifikant unter dem Niveau der NaCl-Kontrollgruppe. So fiel der BE der mit PEG-PLGA infundierten Tiere von initial  $1,5 \pm 0,4$  mmol/l auf final  $-2,9 \pm 0,3$  mmol/l. In der Versuchsgruppe der PEG-PLGA+PFD-Mikrokapseln zeigte sich eine ähnliche Erniedrigung des BE von  $0,7 \pm 1,6$  mmol/l (0 min) auf  $-2,8 \pm 0,6$  mmol/l (300 min). Analog dazu verlief die Standardbikarbonatkonzentration ( $HCO_3^-$ ) für beide Mikrokapselversuchsgruppen während des gesamten Versuches signifikant unter dem Niveau der NaCl-Kontrolle (Abb.11D).



**Abbildung 12: Einfluss der verschiedenen Mikrokapseltypen nach i.v. Applikation auf die metabolischen Parameter Glukose und Laktat.** Die narkotisierten und analgesierten Tiere erhielten über eine 60-minütige Infusionsphase 10 ml/kg KGW·h solide (PEG-PLGA) bzw. PFD-gefüllte (PEG-PLGA+PFD) Mikrokapseln. Tiere der Kontrollgruppe (NaCl) wurden mit dem gleichen Volumen isotoner 0,9 %iger Kochsalzlösung infundiert. Alle Parameter wurden unverzüglich nach Abnahme aus heparinisiertem, arteriellem Vollblut bestimmt. Dargestellt sind (A) Glukosekonzentration und (B) Laktatkonzentration. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n=3$  (NaCl),  $n=6$  (PEG-PLGA),  $n=6$  (PEG-PLGA+PFD). Nicht sichtbare SEM-Werte sind durch die Symbole verdeckt.

Die Metabolite Glukose und Laktat unterlagen bei den Tieren der NaCl-Kontrollgruppe über den gesamten Versuchszeitraum leichten Schwankungen (Abb.12). So sank die arterielle Blutglukosekonzentration in der Kontrollgruppe von initial  $164,0 \pm 15,0$  mg/dl auf  $161,3 \pm 13,3$  mg/dl am Versuchsende nach 300 min geringfügig ab (Abb.12A). Bei den Tieren, die eine Infusion der PEG-PLGA+PFD-Mikrokapseln erhielten, stieg der Glukosespiegel von anfangs  $168,7 \pm 7,0$  mg/dl auf  $256,2 \pm 19,3$  mg/dl direkt nach der Infusion an. Während der anschließenden vierstündigen Beobachtungsphase fiel die Konzentration stetig auf  $90,8 \pm 11,0$  mg/dl am Versuchsende (300 min) ab und lag damit deutlich unter dem Niveau der NaCl-Kontrollgruppe. In der PEG-PLGA-Versuchsgruppe konnte der starke Anstieg des Glukosespiegels zum Infusionsende nicht beobachtet werden. Jedoch lag auch in dieser Gruppe mit  $105,7 \pm 8,8$  mg/dl eine im Vergleich zur Kontrollgruppe wesentlich erniedrigte Konzentration am Versuchsende vor.

Ähnlich der arteriellen Blutglukosekonzentration unterlag die gemessene Laktatkonzentration in der NaCl-Kontrollgruppe leichten Schwankungen, so dass sie in der Kontrollgruppe von anfangs  $1,0 \pm 0,1$  mmol/l geringfügig auf  $1,1 \pm 0,2$  mmol/l bis zum Versuchsende (300 min) anstieg (Abb.12B). Bei den Tieren, die eine Infusion der PEG-PLGA+PFD-Mikrokapseln erhielten, stieg die Laktatkonzentration von initial

$0,8 \pm 0,1$  mmol/l zunächst auf  $1,9 \pm 0,1$  mmol/l relevant an, um im weiteren Versuchsverlauf wieder abzusinken, so dass ein finaler Wert von  $1,2 \pm 0,1$  mmol/l zu messen war. Bei den Tieren, die mit einer Suspension von PEG-PLGA-Mikrokapseln infundiert wurden, war kein wesentlicher Anstieg der Laktatkonzentration direkt nach der intravenösen Injektion zu beobachten. Jedoch erhöhte sie sich im weiteren Versuchsverlauf bis 120 min nach dem Start der Infusion von initial  $0,8 \pm 0,02$  mmol/l auf  $1,7 \pm 0,1$  mmol/l und lag damit klar über der gemessenen Laktatkonzentration der NaCl-Kontrollgruppe. Bis zum Ende des Versuches fiel die Konzentration wieder auf  $1,2 \pm 0,1$  mmol/l ab.

Die Plasmakonzentrationen der Elektrolyte Kalium ( $K^+$ ), Natrium ( $Na^+$ ), Calcium ( $Ca^{2+}$ ) und Chlorid ( $Cl^-$ ) zeigten während des gesamten Versuchsverlaufes, unabhängig der jeweils eingesetzten Kapselinfusionslösung, keine wesentlichen Unterschiede innerhalb der Gruppen bzw. im Vergleich mit der NaCl-Kontrollgruppe (Tab.7). Der Hämoglobingehalt bzw. Hämatokrit des arteriellen Vollbluts sank infolge der Verdünnung durch die Infusion in allen Versuchsgruppen leicht ab.

**Tabelle 7: Einfluss der verschiedenen Mikrokapseltypen nach i.v. Applikation auf den Sauerstoffpartialdruck ( $pO_2$ ), Elektrolyte sowie Hämoglobin und Hämatokrit der Ratte.**

Dargestellt sind der  $pO_2$ , der Hämoglobingehalt und Hämatokrit sowie die Elektrolytkonzentrationen von Kalium ( $K^+$ ), Natrium ( $Na^+$ ), Calcium ( $Ca^{2+}$ ) und Chlorid ( $Cl^-$ ) jeweils beginnend vor dem Start der Applikation (0 min) der versuchsgruppenabhängigen Infusionslösung bis 60 min, 120 min, 180 min, 300 min danach. Alle Parameter wurden unverzüglich nach Abnahme aus heparinisiertem, arteriellem Vollblut bestimmt. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM, n=3 (NaCl), n=6 (PEG-PLGA), n=6 (PEG-PLGA+PFD).

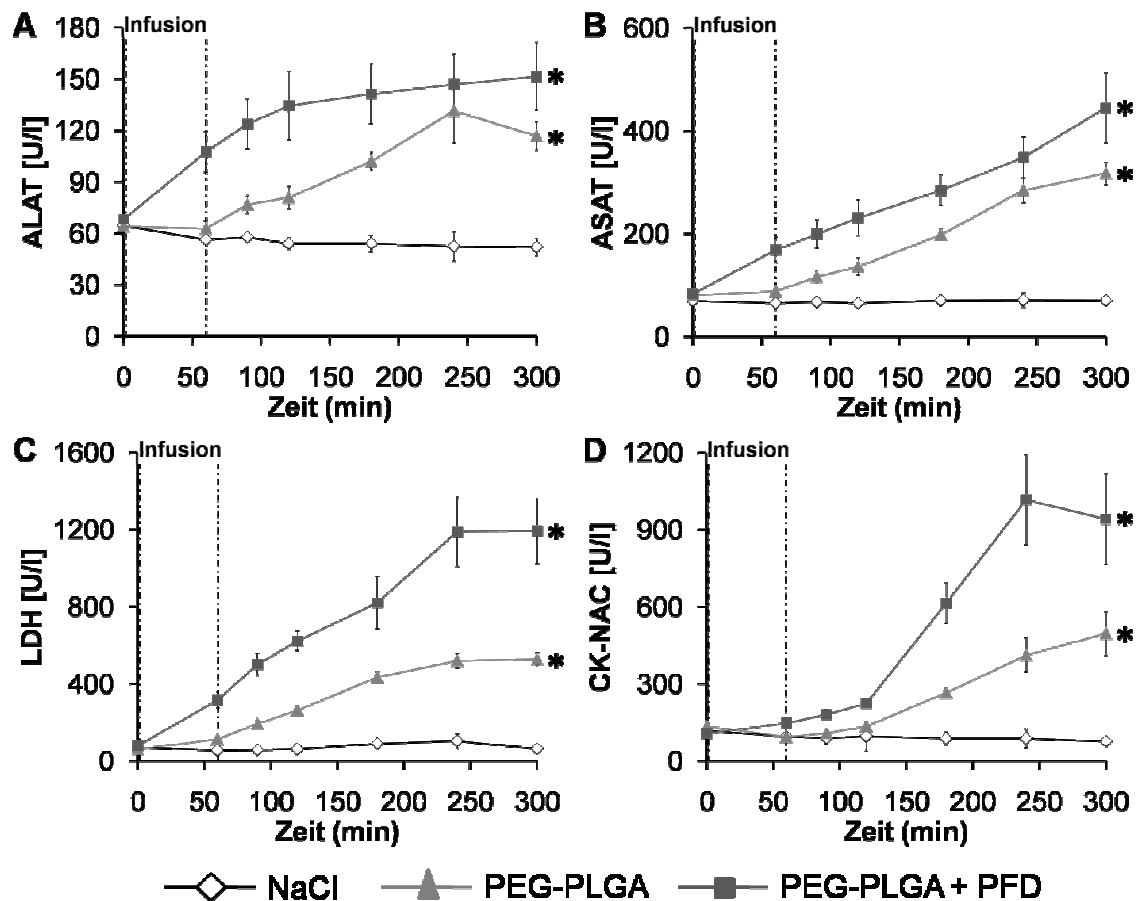
Gruppe	0 min (vor der Infusion)	60 min nach Infusionsstart	120 min nach Infusionsstart	180 min nach Infusionsstart	300 min nach Infusionsstart
$pO_2$ (mmHg)					
NaCl	$435,7 \pm 39$	$447,3 \pm 33$	$458,5 \pm 18$	$392,7 \pm 81$	$444,3 \pm 53$
PEG-PLGA	$506,2 \pm 9$	$489,7 \pm 9$	$495,3 \pm 9$	$483,2 \pm 9$	$460,3 \pm 9$
PEG-PLGA+PFD	$493,7 \pm 16$	$520,4 \pm 15$	$473,2 \pm 16$	$473,5 \pm 17$	$446,3 \pm 20$
Hämoglobingehalt [mg/dl]					
NaCl	$13,4 \pm 0,65$	$12,4 \pm 0,63$	$11,6 \pm 1,45$	$12,0 \pm 0,61$	$11,9 \pm 0,61$
PEG-PLGA	$13,4 \pm 0,49$	$10,2 \pm 0,39$	$10,6 \pm 0,53$	$11,2 \pm 0,51$	$10,6 \pm 0,46$
PEG-PLGA+PFD	$13,4 \pm 0,52$	$13,4 \pm 0,26$	$12,5 \pm 0,37$	$12,9 \pm 0,34$	$12,0 \pm 0,39$
Hämatokrit (%)					
NaCl	$41,1 \pm 2,00$	$38,4 \pm 1,89$	$35,6 \pm 4,45$	$36,9 \pm 1,86$	$36,8 \pm 1,82$
PEG-PLGA	$41,1 \pm 1,45$	$31,4 \pm 1,19$	$32,7 \pm 1,58$	$34,6 \pm 1,56$	$32,7 \pm 1,37$
PEG-PLGA+PFD	$41,6 \pm 1,59$	$41,2 \pm 0,78$	$38,5 \pm 1,13$	$39,6 \pm 1,03$	$36,7 \pm 1,15$
$K^+$ [mmol/l]					
NaCl	$5,1 \pm 0,09$	$5,2 \pm 0,13$	$5,1 \pm 0,17$	$4,9 \pm 0,06$	$5,1 \pm 0,21$
PEG-PLGA	$5,2 \pm 0,10$	$4,8 \pm 0,04$	$4,3 \pm 0,09$	$4,6 \pm 0,17$	$4,8 \pm 0,21$
PEG-PLGA+PFD	$5,1 \pm 0,09$	$4,8 \pm 0,10$	$4,5 \pm 0,09$	$4,8 \pm 0,04$	$5,0 \pm 0,10$



Gruppe	0 min (vor der Infusion)	60 min nach Infusionsstart	120 min nach Infusionsstart	180 min nach Infusionsstart	300 min nach Infusionsstart
Na <sup>+</sup> [mmol/l]					
NaCl	137,3 ± 0,9	139,7 ± 1,20	140,3 ± 1,45	141,0 ± 1,53	141,3 ± 1,33
PEG-PLGA	138,3 ± 0,4	139,2 ± 0,48	140,0 ± 0,58	140,0 ± 0,37	139,8 ± 0,17
PEG-PLGA+PFD	137,7 ± 1,2	137,8 ± 0,31	140,0 ± 0,58	140,2 ± 0,17	141,0 ± 0,73
Ca <sup>2+</sup> [mmol/l]					
NaCl	1,43 ± 0,02	1,45 ± 0,02	1,47 ± 0,05	1,45 ± 0,02	1,42 ± 0,02
PEG-PLGA	1,42 ± 0,01	1,42 ± 0,02	1,41 ± 0,03	1,46 ± 0,02	1,37 ± 0,01
PEG-PLGA+PFD	1,43 ± 0,01	1,36 ± 0,03	1,36 ± 0,03	1,37 ± 0,03	1,33 ± 0,04
Cl <sup>-</sup> [mmol/l]					
NaCl	105,7 ± 1,2	111,0 ± 1,53	112,3 ± 2,33	113,0 ± 0,58	112,3 ± 0,33
PEG-PLGA	105,2 ± 0,5	111,7 ± 0,99	114,8 ± 1,25	112,7 ± 1,20	111,7 ± 0,33
PEG-PLGA+PFD	105,6 ± 1,5	110,0 ± 0,89	114,8 ± 1,25	112,7 ± 0,67	112,8 ± 0,95

### 3.1.3 Einfluss von i.v. applizierten soliden (PEG-PLGA) bzw. mit Perfluordekalin-gefüllten (PEG-PLGA+PFD) Mikrokapseln auf Enzymaktivitäten sowie die Konzentration freien Hämoglobins im Plasma

Die Auswertung der Plasmaenzymaktivitäten der gemessenen Markerenzyme zeigte ausnahmslos signifikante Unterschiede der beiden Mikrokapselversuchsgruppen im Vergleich mit der NaCl-Kontrollgruppe (Abb.13). Im Gegensatz dazu ergab der Vergleich der Konzentration freien Hämoglobins im Plasma zwischen den mit Mikrokapseln infundierten Tieren und der NaCl-Kontrolle lediglich marginale Abweichungen (Abb.14).



**Abbildung 13: Einfluss der verschiedenen Mikrokapseltypen nach i.v. Applikation auf die Aktivitäten der Plasmaenzyme Alanin- und Aspartataminotransferase, Laktatdehydrogenase und Kreatinkinasen.** Die narkotisierten und analgesiierten Tiere erhielten über eine 60-minütige Infusionsphase 10 ml/kg KGW·h solide (PEG-PLGA) bzw. PFD-gefüllte (PEG-PLGA+PFD) Mikrokapseln. Tiere der Kontrollgruppe (NaCl) wurden mit dem gleichen Volumen isotoner 0,9 %iger Kochsalzlösung infundiert. Alle Parameter wurden im Blutplasma bestimmt. Dargestellt sind (A) Alaninaminotransferaseaktivität (ALAT), (B) Aspartataminotransferaseaktivität (ASAT), (C) Laktatdehydrogenaseaktivität (LDH) und (D) Kreatinkinasenaktivität (CK-NAC). Die gezeigten Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n=3$  (NaCl),  $n=6$  (PEG-PLGA),  $n=6$  (PEG-PLGA+PFD). Nicht sichtbare SEM-Werte sind durch die Symbole verdeckt. \* $p < 0,05$  (PEG-PLGA bzw. PEG-PLGA+PFD vs. NaCl-Kontrolle während des gesamten Versuchszeitraumes).

Die intravenöse Injektion von NaCl ergab in der Kontrollgruppe keine Aktivitätsveränderungen der plasmatischen Enzyme Alaninaminotransferase (ALAT), Aspartataminotransferase (ASAT), Laktatdehydrogenase (LDH) und der Kreatinkinasen (CK-NAC) (Abb.13).

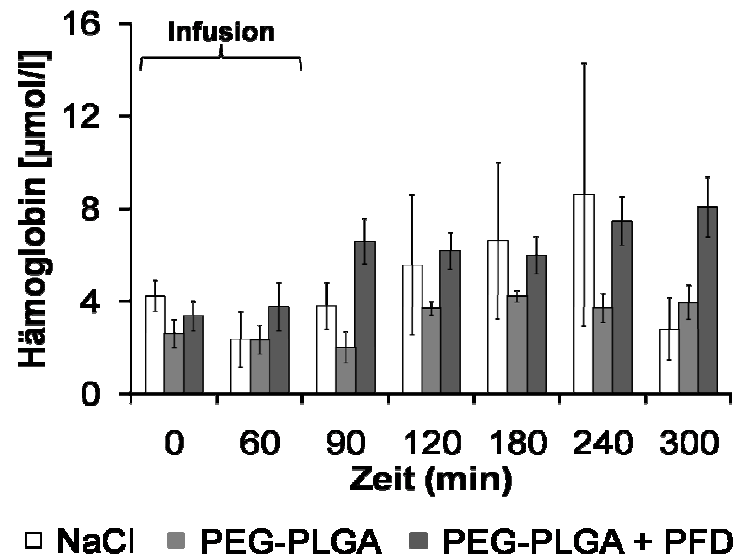
Die Aktivitäten der beiden gemessenen Aminotransferasen ALAT und ASAT stiegen bereits direkt nach Infusion der PEG-PLGA+PFD-Mikrokapseln gegenüber der NaCl-Kontrollgruppe signifikant an (Abb.13A/B; ALAT: von  $68,2 \pm 1,5$  U/l auf  $107,5 \pm 12,0$  U/l;

ASAT: von  $83,3 \pm 9,3$  U/l auf  $168,7 \pm 24,7$  U/l). Im weiteren Versuchsverlauf erhöhten sich die Aktivitäten dieser beiden Enzyme weiterhin, so dass am Versuchsende eine plasmatische Enzymaktivität von  $151,6 \pm 19,7$  U/l (ALAT) bzw.  $444,5 \pm 67,8$  U/l (ASAT) bestimmt wurde. Die Applikation der PEG-PLGA-Mikrokapseln führte im Vergleich mit den PEG-PLGA+PFD-Mikrokapseln zu einem um ca. 30 min verzögerten Anstieg der Enzymaktivitäten. So lagen diese direkt nach der PEG-PLGA-Infusion mit  $62,8 \pm 4,6$  U/l (ALAT) und  $88,1 \pm 8,6$  U/l (ASAT) noch im Bereich des Basis- und Kontrollgruppenwertes (Basis (0 min):  $64,2 \pm 2,1$  U/l (ALAT);  $80,4 \pm 6,6$  U/l (ASAT); Kontrolle:  $56,3 \pm 1,9$  U/l (ALAT);  $65,5 \pm 2,2$  U/l (ASAT)), begannen jedoch anschließend kontinuierlich zu steigen, bis am Versuchsende eine im Vergleich mit der NaCl-Kontrollgruppe signifikant erhöhte Enzymaktivität von  $116,8 \pm 8,2$  U/l (ALAT) bzw.  $317,7 \pm 21,9$  U/l (ASAT) vorlag. Die plasmatische ALAT- bzw. ASAT-Aktivität der NaCl-Kontrollgruppe lag während des gesamten Versuchszeitraumes konstant um  $55,9 \pm 4,4$  U/l bzw.  $68,6 \pm 2,3$  U/l.

Ähnlich zu den Verläufen der Transaminasenaktivitäten verhielt sich auch die gemessene LDH-Aktivität (Abb.13C). Direkt nach Infusion der PEG-PLGA+PFD-Mikrokapseln stieg diese von initial  $78,6 \pm 13,0$  U/l auf  $316,4 \pm 43,0$  U/l im Vergleich mit der NaCl-Kontrollgruppe signifikant an. Im weiteren Versuchsverlauf erhöhte sich die plasmatische Enzymaktivität kontinuierlich, so dass am Versuchsende (300 min) eine Aktivität von  $1193,1 \pm 168,3$  U/l vorlag. Im Vergleich dazu verlief der Anstieg der Enzymaktivität der mit PEG-PLGA-Mikrokapseln infundierten Tiere weniger ausgeprägt, aber dennoch signifikant von  $62,1 \pm 3,4$  U/l auf  $528,2 \pm 33,6$  U/l am Ende des Versuches. Die LDH-Aktivität der NaCl-Kontrollgruppe befand sich während des gesamten Versuchszeitraumes stabil bei  $71,0 \pm 18,2$  U/l.

Die Analyse der CK-NAC zeigte bei den Tieren der PEG-PLGA+PFD-Mikrokapselgruppe bereits direkt nach der Infusion (60 min) mit  $147,2 \pm 11,2$  U/l einen signifikanten Anstieg der Enzymaktivität im Vergleich mit der NaCl-Kontroll- und PEG-PLGA-Gruppe (Abb.13D; NaCl:  $95,0 \pm 3,5$  U/l; PEG-PLGA:  $93,7 \pm 11,4$  U/l). Die CK-NAC stieg weiter an, so dass 120 min nach dem Start der Infusion eine Aktivität von  $223,8 \pm 4,8$  U/l in der PEG-PLGA+PFD-Gruppe gemessen wurde. Ab diesem Zeitpunkt kam es zu einer deutlichen Zunahme der Enzymaktivität, so dass am Versuchsende  $942 \pm 175,4$  U/l bestimmt wurden. Analog dazu verhielt sich der Kurvenverlauf in der Gruppe der mit PEG-PLGA-Mikrokapseln infundierten Tiere, auch wenn der Anstieg deutlich weniger ausgeprägt war. Am Versuchsende wurde mit  $495,8 \pm 85,3$  U/l etwa die Hälfte der Enzymaktivität detektiert. Die plasmatische Aktivität von CK-NAC der NaCl-Kontrollgruppe blieb während des gesamten Versuchszeitraumes konstant zwischen  $117,3 \pm 32,5$  U/l (0 min) und  $76,7 \pm 10,9$  U/l (300 min).

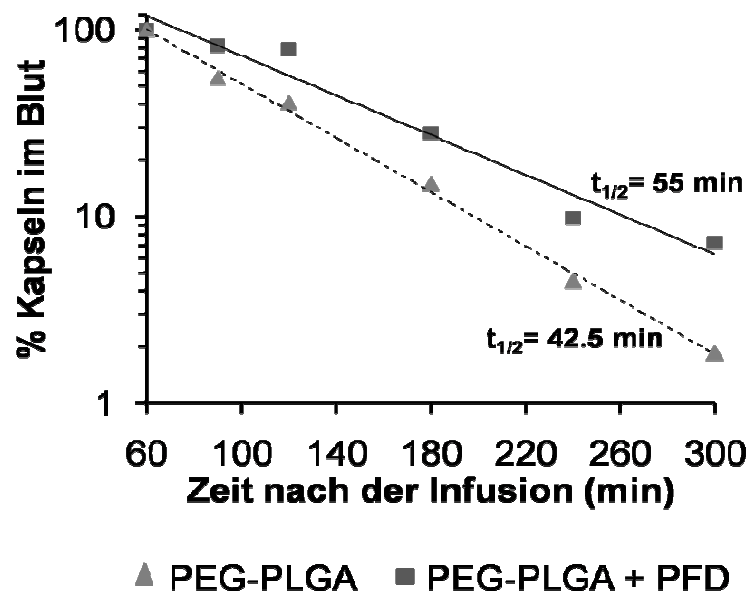
Die Auswertung der photometrischen Bestimmung von freiem Hämoglobin im Plasma ergab zu keinem Zeitpunkt wesentliche Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (PEG-PLGA bzw. PEG-PLGA+PFD) und der NaCl-Kontrollgruppe (Abb.14).



**Abbildung 14: Einfluss der verschiedenen Mikrokapseltypen nach *i.v.* Applikation auf die freie Hämoglobinkonzentration im Blutplasma.** Die narkotisierten und analgesierten Tiere erhielten über eine 60-minütige Infusionsphase 10 ml/kg KGW·h solide (PEG-PLGA) bzw. PFD-gefüllte (PEG-PLGA+PFD) Mikrokapseln. Tiere der Kontrollgruppe (NaCl) wurden mit dem gleichen Volumen isotoner 0,9 %iger Kochsalzlösung infundiert. Dargestellt ist die Konzentration an freiem Hämoglobin im Blutplasma. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM, n=3 (NaCl), n=6 (PEG-PLGA), n=6 (PEG-PLGA+PFD).

### 3.1.4 Untersuchungen zur Halbwertszeit von *i.v.* applizierten soliden (PEG-PLGA) bzw. mit Perfluordekalin-gefüllten (PEG-PLGA+PFD) Mikrokapseln

Die Auswertung der prozentualen Abnahme der Kapselkonzentrationen in der Blutzirkulation zu verschiedenen Zeitpunkten nach beendeter Infusion zeigte eine längere Halbwertszeit der mit PFD-gefüllten gegenüber den soliden Mikrokapseln (Abb.15).



**Abbildung 15: Halbwertszeit der verschiedenen Mikrokapseltypen nach *i.v.* Applikation.** Die narkotisierten und analgesi-erten Tiere erhielten über eine 60-minütige Infusionsphase 10 ml/kg KGW·h solide (PEG-PLGA) bzw. PFD-gefüllte (PEG-PLGA+PFD) Mikrokapseln. Dargestellt sind die prozentual im Blut verbliebenen soliden (---) bzw. PFD-gefüllten (—) Mikrokapseln. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte, n=5 (PEG-PLGA), n=5 (PEG-PLGA+PFD).

Bereits 90 min nach Infusionsstart zeigte sich, dass etwa die Hälfte der PEG-PLGA-Mikrokapseln aus der Blutzirkulation entfernt war (55 %). Im Gegensatz dazu konnten zu diesem Zeitpunkt noch etwa 82 % der PFD-gefüllten Mikrokapseln detektiert werden. Am Ende des Versuches nach 300 min waren 98 % der soliden und 93 % der PFD-gefüllten Mikrokapseln aus der Blutzirkulation eliminiert. Damit war die Halbwertszeit mit 42,5 min für die PEG-PLGA-Mikrokapseln rund 13 min kürzer im Vergleich zu den PEG-PLGA+PFD-Mikrokapseln ( $t_{1/2} = 55$  min).

### **3.1.5 Einfluss von i.v. applizierten soliden (PEG-PLGA) bzw. mit Perfluordekalin-gefüllten (PEG-PLGA+PFD) Mikrokapseln auf die Dünndarmschädigung**

Die makroskopische Begutachtung der *Mukosa* (2.11) war sowohl bei den Tieren der NaCl-Kontrollgruppe als auch bei den Tieren, die eine Mikrokapselinfusion erhielten, ohne Befund (nicht dargestellt).

Neben der makroskopischen Beurteilung der Schädigung der luminalen Darmwand wurde zusätzlich die äußere Darmwand der zehn Segmente charakterisiert. Diese Begutachtung ergab bei den Därmen der Tiere, die eine Infusion von PFD-gefüllten PEG-PLGA-Mikrokapseln erhielten, vereinzelt Petechien, die sich über den gesamten Dünndarm erstreckten, vor allem aber im vierten Darmsegment lokalisiert waren. Das vierte Darmsegment der NaCl-Kontrolle und der PEG-PLGA-Mikrokapselgruppe zeigte keinerlei punktförmige Einblutungen.

### 3.2 Bestimmung der toxikologischen Auswirkungen einer Infusion von Polyvinylalkohol (PVA) bzw. mit Perfluordekalin-gefüllten (PEG-PLGA+PFD) Mikrokapseln (Serie 2)

Bereits in der ersten Versuchsserie, die primär die Bestimmung der Mikrokapselhalbwertszeit im Blutkreislauf zum Ziel hatte (3.1), konnten Auswirkungen einer Infusion von PEG-PLGA+PFD-Mikrokapseln auf den *Base Excess* (BE), Plasmaenzymaktivitäten sowie auf systemische und metabolische Parameter dokumentiert werden. Im Rahmen der zweiten Versuchsserie wurden, um den Zeitpunkt einer eintretenden Schädigung/Immunantwort eingrenzen zu können, drei Zeitpunkte für das Versuchsende festgelegt (90, 150 und 270 min) und zusätzliche Untersuchungen, wie die Bestimmung von Inflammationsparametern (Zytokine, Komplementfaktoren) sowie Messungen zur Beurteilung einer möglicherweise aufgetretenen Gerinnungsstörung durchgeführt. Für die Evaluierung der gewonnenen Daten bedeutete dies, dass die Dokumentation der Vitalparameter, Blutgasanalyse und Plasmaenzymaktivitäten in allen drei Gruppen (Versuchsdauer 90, 150 und 270 min) kontinuierlich während der gesamten Versuchsdauer erfolgte. Auf die Darstellung dieser Parameter aus den Gruppen 90 min und 150 min wurde zur besseren Übersicht aufgrund der annähernden Deckungsgleichheit der Kurvenverläufe mit denjenigen der 270 min Gruppe verzichtet. Die Nitritkonzentration, Komplementfaktoren und Zytokine wurden, aufgrund des hohen benötigten Probenvolumens, lediglich final (nach 90, 150 und 270 min) gemessen. Weiterhin wurde eine kapselfreie Polyvinylalkohollösung (PVA-Lösung) als eigenständige Versuchsgruppe integriert, um toxikologische Effekte des zur Kapselsynthese eingesetzten Emulgators ausschließen zu können.

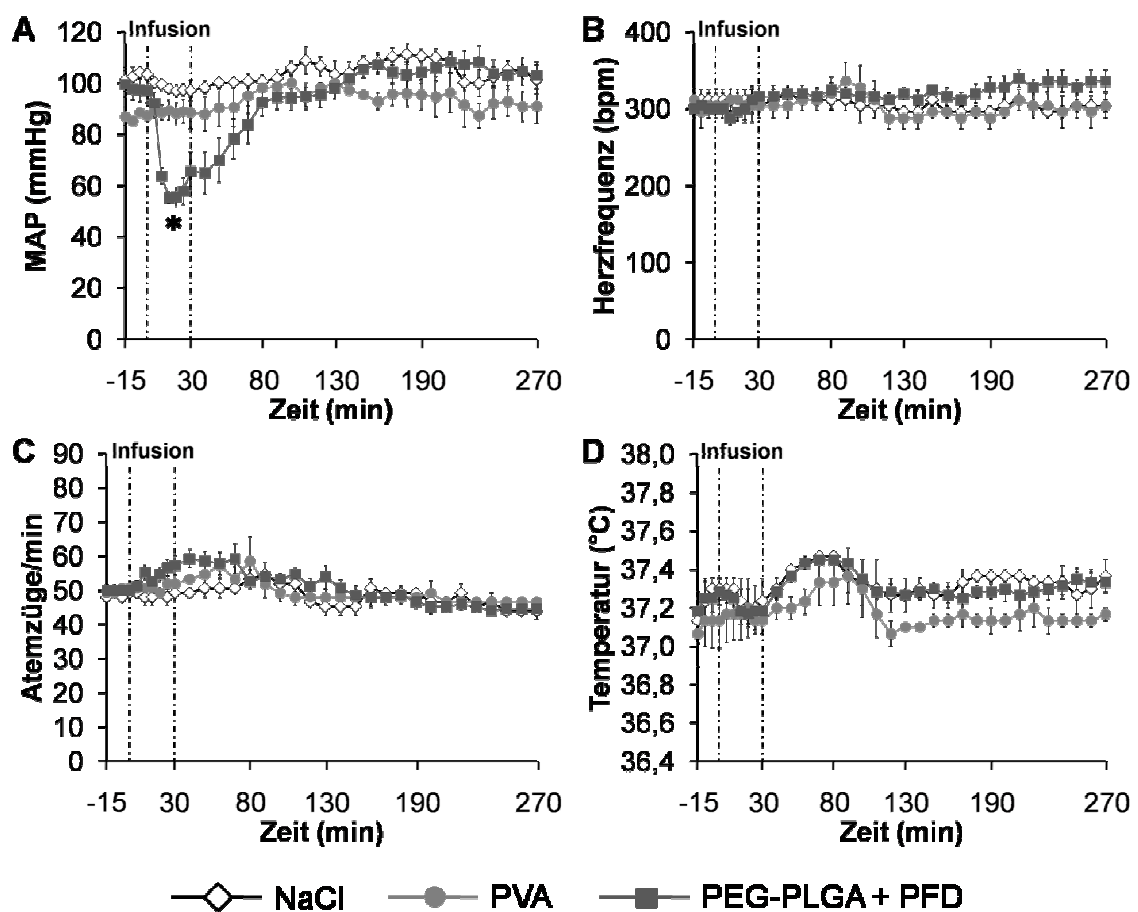
Tiere, die eine Infusion der PEG-PLGA+PFD-Mikrokapseln erhielten, zeigten trotz verdoppelter Infusionsgeschwindigkeit bei gleicher Kapselmenge mit der ersten Serie vergleichbare Werte. Die intravenöse Applikation der PVA-Lösung resultierte weder bei den Vitalparametern noch bei Parametern der Blutgasanalysen oder den Plasmaenzymaktivitäten in signifikanten Veränderungen gegenüber der NaCl-Kontrollgruppe. Die Bestimmung des Nitritgehaltes ergab lediglich in der PEG-PLGA+PFD-Versuchsgruppe nach 270 min einen signifikanten Konzentrationsanstieg im Vergleich mit der NaCl-Kontrolle. Die Evaluation der viskoelastischen Eigenschaften des Blutes zeigte lediglich bei der Geschwindigkeit der Gerinnungsbildung (*clot formation time*; CFT) 150 min und 270 min nach dem Start einer Infusion von PEG-PLGA+PFD-Mikrokapseln einen signifikanten Abfall im Vergleich mit der NaCl-Kontrollgruppe. Deutliche Unterschiede zwischen der NaCl- und PEG-PLGA+PFD-Versuchsgruppe zeigten sich auch in der Analyse der Komplementfaktoren und Zytokine. Vor allem

Komplementfaktor 4a sowie die Zytokine Interleukin-6-, 1 $\beta$  und 10 sowie der Tumornekrosefaktor- $\alpha$  resultierten in signifikant erhöhten Plasmakonzentrationen. Nach Infusion von PEG-PLGA+PFD-Mikrokapseln blieb die histopathologische Begutachtung des vierten Dünndarmsegments sowie der Lunge ohne Befund. Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbte Präparate der Milz und Leber zeigten dagegen in hohem Maße veränderte und geschädigte Gewebestrukturen.



### 3.2.1 Einfluss von i.v. appliziertem PVA bzw. mit Perfluordekalin-gefüllten (PEG-PLGA+PFD) Mikrokapseln auf die Vitalparameter der Ratte

Bei der Auswertung der zweiten Versuchsserie hinsichtlich der systemischen Parameter der Ratte zeigten sich bei den Tieren, die eine Infusion von PEG-PLGA+PFD-Mikrokapseln erhielten, deutlich die bereits in 3.1 beschriebenen Effekte auf den MAP. Keinen Einfluss auf den MAP sowie auf Herz- und Atemfrequenz sowie Körpertemperatur konnten durch die intravenöse Applikation von NaCl (Kontrolle) und kapselfreier 0,25 %iger PVA-Lösung dokumentiert werden (Abb.16).



**Abbildung 16:** Einfluss der i.v. Applikation von kapselfreier PVA-Lösung und PFD-gefüllten PEG-PLGA-Mikrokapseln auf die Vitalparameter der Ratte. Die narkotisierten und analgesi-erten Tiere erhielten während einer 30-minütigen Infusionsphase 20 ml/kg KGW·h entweder kapselfreie 0,25 %ige PVA-Lösung (PVA) oder PFD-gefüllte Mikrokapseln (PEG-PLGA+PFD). Tiere der Kontrollgruppe (NaCl) wurden mit dem gleichen Volumen isotoner 0,9 %iger Kochsalzlösung infundiert. Dargestellt sind (A) der MAP, (B) die Herzfrequenz, (C) die Atemfrequenz und (D) die Körpertemperatur. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM, n=3 (NaCl), n=3 (PVA), n=6 (PEG-PLGA+PFD). Nicht sichtbare SEM-Werte sind durch die Symbole verdeckt. \*p < 0,05 (PEG-PLGA+PFD vs. NaCl-Kontrolle während der Infusion).

Der MAP der NaCl-Kontrollgruppe unterlag während des gesamten Versuchszeitraumes physiologischen Schwankungen, lag aber dennoch fortwährend zwischen  $97 \pm 3$  mmHg und  $111 \pm 4$  mmHg (Abb.16A). Ähnlich verhielt es sich in der Gruppe der mit PVA infundierten Tiere. Der MAP befand sich hier weitgehend zwischen  $85 \pm 2$  mmHg und  $100 \pm 3$  mmHg und damit leicht unter dem Niveau der Kontrollgruppe. Bei den Tieren, die eine Infusion von PEG-PLGA+PFD-Mikrokapseln erhielten, fiel der MAP kurzzeitig und im Vergleich mit der NaCl-Kontrollgruppe signifikant auf ein Minimum von  $55 \pm 2$  mmHg 15 min nach dem Start der intravenösen Applikation. Anschließend stieg der MAP langsam aber stetig an, um nach etwa 70 min wieder das Niveau der beiden anderen Versuchsgruppen zu erreichen. In der vierstündigen Beobachtungsphase blieb der MAP aller Versuchsgruppen weitgehend stabil, so dass am Versuchsende die Werte mit  $102 \pm 6$  mmHg (NaCl),  $91 \pm 7$  mmHg (PVA) und  $103 \pm 5$  mmHg (PEG-PLGA+PFD) in einem vergleichbaren Bereich lagen.

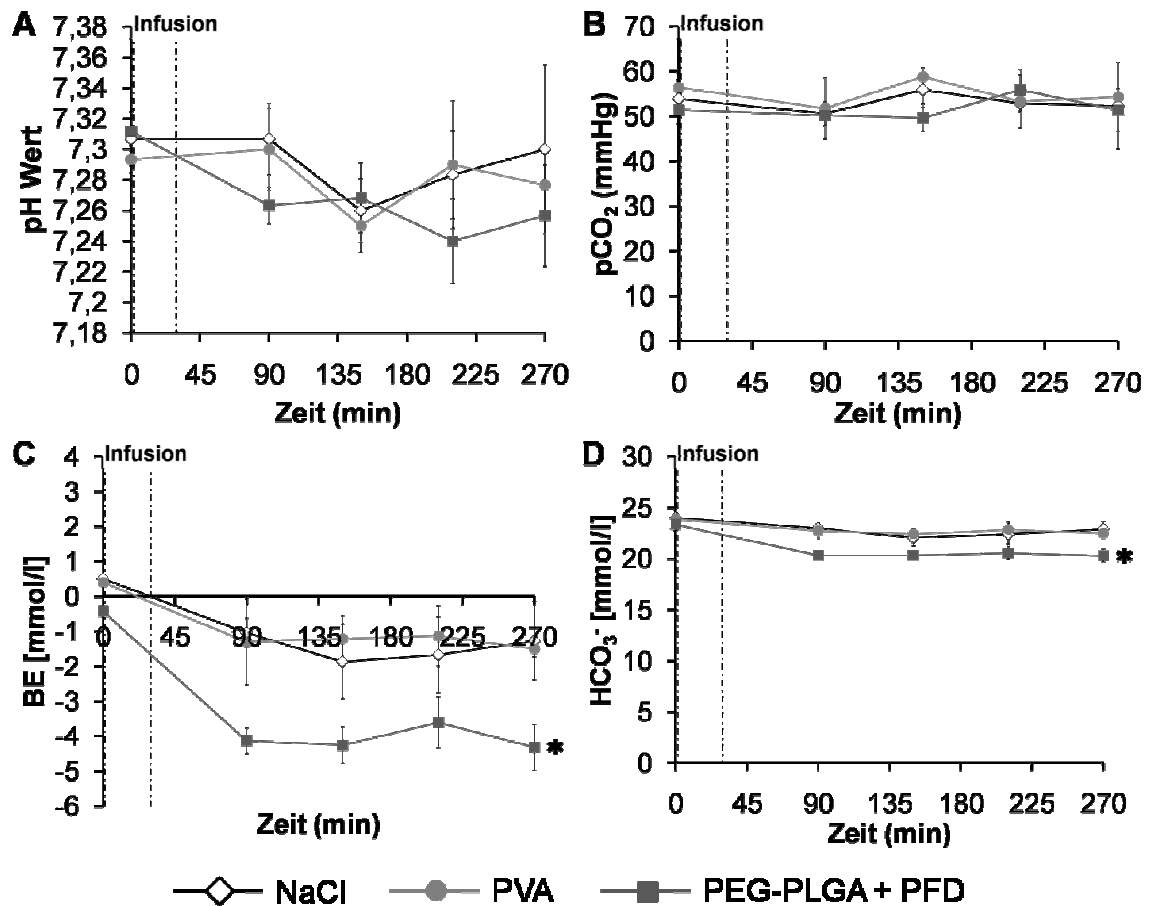
Die Herzfrequenz blieb in allen drei Versuchsgruppen während des gesamten Versuchszeitraumes stabil bei etwa 300 bpm (Abb.16B).

Divergierend zu der Atemfrequenz der Tiere der Kontrollgruppe, die zu Beginn des Versuches und während der Infusion bei rund 49 Atemzüge/min lag, stiegen die Frequenzen bei den mit PEG-PLGA+PFD-Mikrokapseln bzw. PVA-Lösung infundierten Tiere leicht an (Abb.16C). So erhöhte sich die Atmung in der Mikrokapselversuchsgruppe von  $50 \pm 2$  Atemzüge/min (0 min) auf  $57 \pm 3$  Atemzüge/min (30 min). Im Falle der PVA infundierten Tiere stieg der Wert von initial  $49 \pm 1$  Atemzüge/min auf  $52 \pm 2$  Atemzüge/min am Infusionsende. Am Versuchsende lagen die dokumentierten Atemfrequenzen der drei Versuchsgruppen mit  $44 \pm 2$  Atemzüge/min (NaCl),  $47 \pm 1$  Atemzüge/min (PVA) und  $45 \pm 2$  Atemzüge/min (PEG-PLGA+PFD) im gleichen Bereich.

Die Körpertemperatur der Versuchstiere unterlag in allen drei Gruppen den typischen Schwankungen um  $37^\circ\text{C}$  und stieg zu keinem Zeitpunkt wesentlich an oder fiel ab (Abb.16D).

### **3.2.2 Einfluss von i.v. appliziertem PVA bzw. mit Perfluordekalin-gefüllten (PEG-PLGA+PFD) Mikrokapseln auf Parameter der Blutgasanalyse, metabolische Parameter sowie Elektrolyte**

Die Evaluierung des Einflusses von PEG-PLGA+PFD-Mikrokapseln auf den Säure-Basen-Haushalt und metabolische Parameter zeigten zum Teil signifikante Unterschiede im Vergleich zur NaCl-Kontrollgruppe (Abb.17, 18).



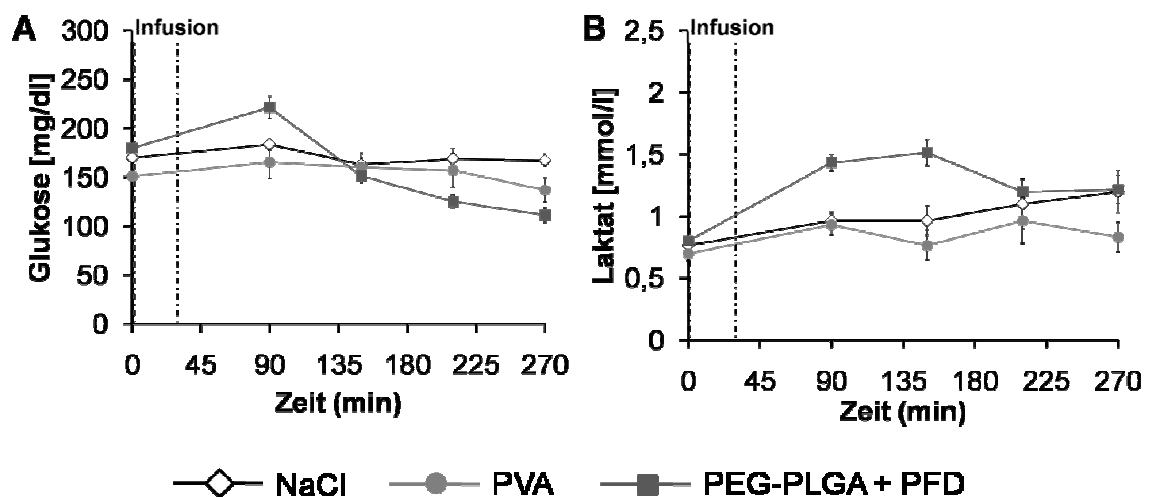
**Abbildung 17: Einfluss der i.v. Applikation von kapselfreier PVA-Lösung und PFD-gefüllten PEG-PLGA-Mikrokapseln auf die Parameter der Blutgasanalyse.** Die narkotisierten und analgesi-erten Tiere erhielten während einer 30-minütigen Infusionsphase 20 ml/kg KGW·h entweder kapselfreie 0,25 %ige PVA-Lösung (PVA) oder PFD-gefüllte Mikrokapseln (PEG-PLGA+PFD). Tiere der Kontrollgruppe (NaCl) wurden mit dem gleichen Volumen isotoner 0,9 %iger Kochsalzlösung infundiert. Alle Parameter wurden unverzüglich nach Abnahme aus heparinisiertem, arteriellem Vollblut bestimmt. Dargestellt sind (A) pH-Wert, (B) Kohlenstoffdioxidpartialdruck (pCO<sub>2</sub>), (C) *Base Excess* (BE) und (D) Standardbicarbonatkonzentration (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± SEM, n=3 (NaCl), n=3 (PVA), n=6 (PEG-PLGA+PFD). Nicht sichtbare SEM-Werte sind durch die Symbole verdeckt. \*p < 0,05 (PEG-PLGA+PFD vs. NaCl-Kontrolle während des gesamten Versuchszeitraumes).

In den Versuchen der mit PEG-PLGA+PFD-Mikrokapseln behandelten Tiere sank der pH-Wert 90 min nach dem Start der Infusion von initial  $7,31 \pm 0,01$  auf  $7,26 \pm 0,01$  (Abb.17A) und verblieb bis zum Versuchsende auf diesem Niveau. Im Gegensatz dazu blieb der pH-Wert der PVA- und NaCl-Versuchsgruppe während des gesamten Versuchszeitraumes, mit Ausnahme des Wertes zum Zeitpunkt 150 min nach dem Start der Infusion, verhältnismäßig konstant bei etwa 7,3.

Der Kohlenstoffdioxidpartialdruck ( $p\text{CO}_2$ ) unterlag den durch die atemdepressive Wirkung des Inhalationsnarkotikums Isofluran bedingten typischen Schwankungen um 55 mmHg, veränderte sich aber zu keinem Zeitpunkt und in keiner der drei Versuchsgruppen wesentlich (Abb.17B).

Der BE fiel sowohl bei den Tieren der Kontrollgruppe als auch bei den Tieren der PVA-Versuchsgruppe von initial  $0,5 \pm 1,1$  mmol/l (NaCl) bzw.  $0,4 \pm 0,7$  mmol/l (PVA) auf  $-1,3 \pm 1,1$  mmol/l (NaCl) bzw.  $-1,5 \pm 0,2$  mmol/l (PVA) am Versuchsende ab (Abb.17C). Der BE der mit PEG-PLGA+PFD-Mikrokapseln infundierten Tiere lag, unter Berücksichtigung des gesamten Versuchszeitraumes, signifikant unter dem Niveau der NaCl-Kontrollgruppe. So fiel der BE von anfänglich  $-0,4 \pm 0,9$  mmol/l auf  $-4,3 \pm 0,7$  mmol/l (final).

Analog dazu stellte sich die Standardbikarbonatkonzentration ( $\text{HCO}_3^-$ ) für die Mikrokapselversuchsgruppe während des gesamten Versuches signifikant unter dem Niveau der NaCl-Kontrolle dar (Abb.17D).



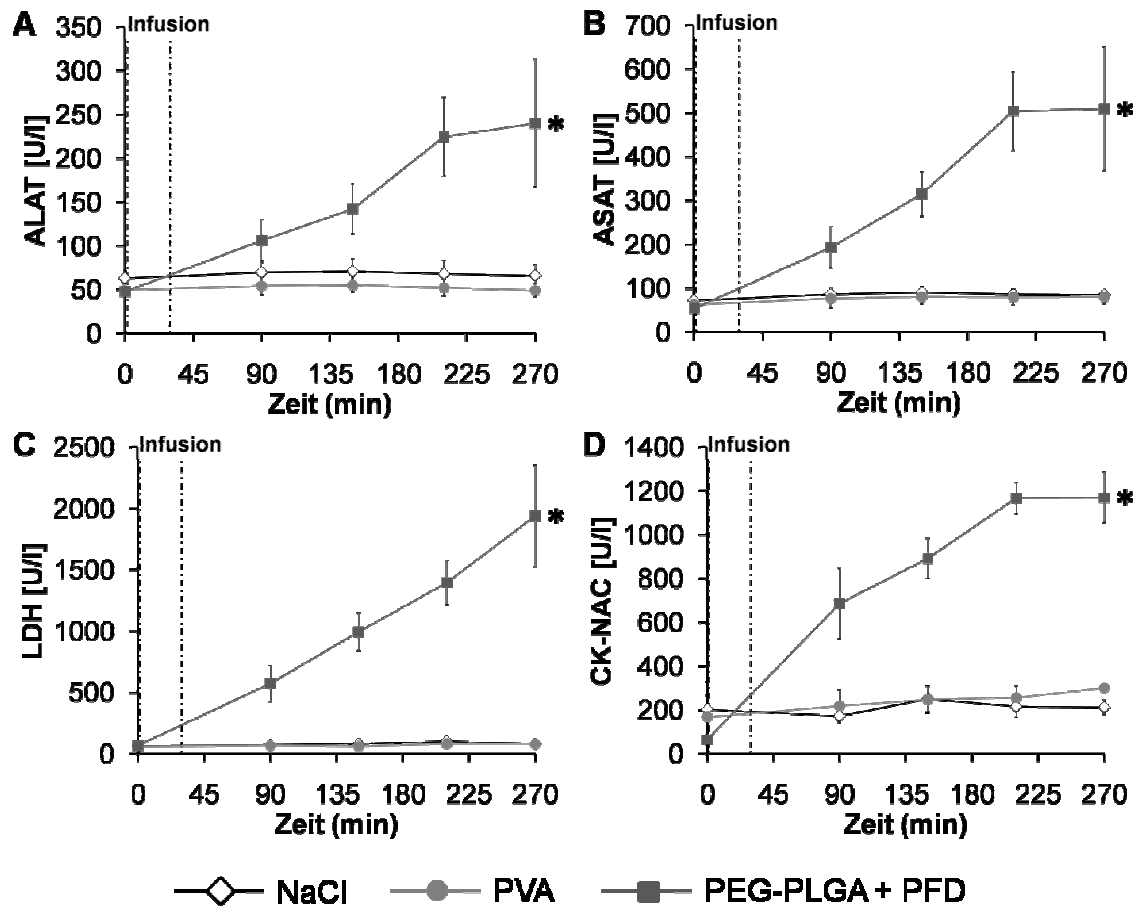
**Abbildung 18:** Einfluss der *i.v.* Applikation von kapselfreier PVA-Lösung und PFD-gefüllten PEG-PLGA-Mikrokapseln auf die metabolischen Parameter Glukose und Laktat. Die narkotisierten und analgesiierten Tiere erhielten während einer 30-minütigen Infusionsphase 20 ml/kg KGW·h entweder kapselfreie 0,25 %ige PVA-Lösung (PVA) oder PFD-gefüllte Mikrokapseln (PEG-PLGA+PFD). Tiere der Kontrollgruppe (NaCl) wurden mit dem gleichen Volumen isotoner 0,9 %iger Kochsalzlösung infundiert. Alle Parameter wurden unverzüglich nach Abnahme aus heparinisiertem, arteriellem Vollblut bestimmt. Dargestellt sind (A) Glukosekonzentration und (B) Laktatkonzentration. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n=3$  (NaCl),  $n=3$  (PVA),  $n=6$  (PEG-PLGA+PFD). Nicht sichtbare SEM-Werte sind durch die Symbole verdeckt.

Die arterielle Blutglukosekonzentration zeigte für die mit NaCl bzw. PEG-PLGA+PFD infundierten Tiere einen mit den Daten der ersten Versuchsserie vergleichbaren Verlauf (Abb.18A/12A). So unterlag die Glukosekonzentration der NaCl-Kontrolle leichten Schwankungen, befand sich aber dennoch vergleichsweise stabil bei  $170,7 \pm 7,7$  mg/dl. Bei den Tieren, die eine Infusion der PEG-PLGA+PFD-Mikrokapseln erhielten, stieg der Glukosespiegel nach erfolgter Infusion deutlich über das Niveau der NaCl-Kontrolle und der PVA-Versuchsgruppe. Bei einer Gesamtversuchsdauer von 270 min stieg die Blutglukose der PEG-PLGA+PFD infundierten Tiere von  $180,0 \pm 4,0$  mg/dl (0 min) auf  $221,5 \pm 10,9$  mg/dl 90 min nach dem Start der Applikationsphase an (NaCl, 90 min:  $183,7 \pm 5,8$  mg/dl; PVA, 90 min:  $165,3 \pm 16,4$  mg/dl). Am Versuchsende zeigte sich, analog zu den Daten der ersten Serie, ein im Vergleich mit der NaCl-Kontrolle deutlich erniedrigter Blutglukosespiegel (NaCl:  $167,3 \pm 6,4$  mg/dl; PEG-PLGA+PFD:  $111,5 \pm 7,2$  mg/dl). Der Unterschied zwischen der Kontrolle und der PVA-Versuchsgruppe präsentierte sich mit  $137,0 \pm 12,3$  mg/dl (PVA) weniger ausgeprägt, aber dennoch deutlich.

Die arterielle Laktatkonzentration zeigte einen mit der ersten Versuchsserie vergleichbaren Verlauf (Abb.18B/12B). In der NaCl-Kontrollgruppe stieg die Konzentration von initial  $0,8 \pm 0,05$  mmol/l geringfügig auf  $1,2 \pm 0,17$  mmol/l an. In der PVA-Versuchsgruppe lagen die Basiswerte bei  $0,7 \pm 0,0$  mmol/l. Über die vierstündige Beobachtungsphase unterlag die Laktatkonzentration marginalen Schwankungen, so dass am Versuchsende die Laktatkonzentration mit  $0,8 \pm 0,12$  mmol/l wieder auf Ausgangsniveau lag. Ein deutlicherer Anstieg ließ sich bei den mit Mikrokapseln infundierten Tieren feststellen. Hier stieg der Wert von anfänglich  $0,6 \pm 0,12$  mmol/l auf  $1,5 \pm 0,1$  mmol/l 150 min nach dem Start der Infusion an. Im weiteren Versuchsverlauf sank die Konzentration mit  $1,2 \pm 0,1$  mmol/l wieder auf Kontrollniveau ab.

### **3.2.3 Einfluss von i.v. appliziertem PVA bzw. mit Perfluordekalin-gefüllten (PEG-PLGA+PFD) Mikrokapseln auf Enzymaktivitäten sowie die Plasmanitritkonzentration**

Bei der Auswertung der Plasmaenzymaktivitäten zeigten sich überwiegend signifikante Unterschiede zwischen der NaCl-Kontrollgruppe und den mit PEG-PLGA+PFD-Mikrokapseln infundierten Tieren (Abb.19). Die Nitritkonzentration in der Mikrokapselversuchsgruppe lag dagegen lediglich nach einer Versuchsdauer von 270 min signifikant über dem Kontrollniveau (Abb.20).



**Abbildung 19:** Einfluss der *i.v.* Applikation von kapselfreier PVA-Lösung und PFD-gefüllten PEG-PLGA-Mikrokapseln auf die Aktivitäten der Plasmaenzyme Alanin- und Aspartataminotransferase, Laktatdehydrogenase und Kreatinkinasen. Die narkotisierten und analgesi-erten Tiere erhielten während einer 30-minütigen Infusionsphase 20 ml/kg KGW·h entweder kapselfreie 0,25 %ige PVA-Lösung (PVA) oder PFD-gefüllte Mikrokapseln (PEG-PLGA+PFD). Tiere der Kontrollgruppe (NaCl) wurden mit dem gleichen Volumen isotoner 0,9 %iger Kochsalzlösung infundiert. Alle Parameter wurden im Blutplasma bestimmt. Dargestellt sind (A) Alaninaminotransferaseaktivität (ALAT), (B) Aspartataminotransferaseaktivität (ASAT), (C) Laktatdehydrogenaseaktivität (LDH) und (D) Kreatinkinasenaktivität (CK-NAC). Die gezeigten Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n=3$  (NaCl),  $n=3$  (PVA),  $n=6$  (PEG-PLGA+PFD). Nicht sichtbare SEM-Werte sind durch die Symbole verdeckt. \* $p < 0,05$  (PEG-PLGA+PFD vs. NaCl-Kontrolle während des gesamten Versuchszeitraumes).

Die intravenöse Applikation von NaCl bzw. PVA bewirkte keine ausgeprägten Aktivitätsveränderungen der plasmatischen Enzyme ALAT, ASAT, LDH und CK-NAC (Abb.19).

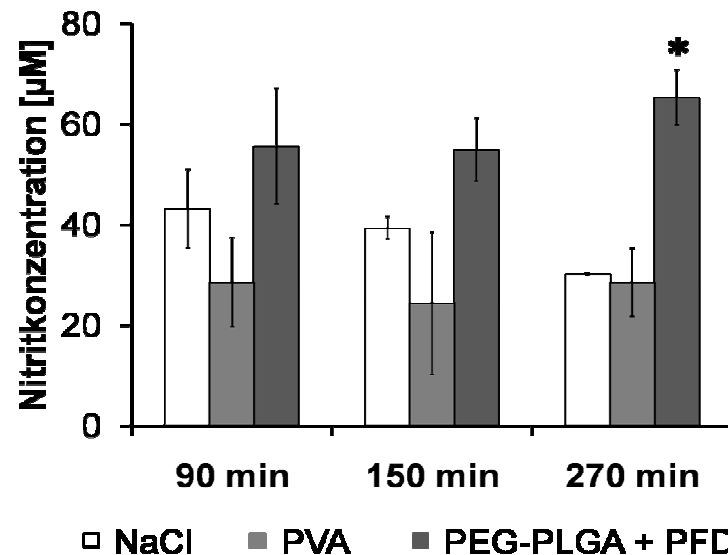
Die Aktivitäten der beiden gemessenen Transaminasen ALAT und ASAT stiegen bereits 90 min nach Infusion der PEG-PLGA+PFD-Mikrokapseln gegenüber der NaCl-Kontrollgruppe deutlich an (Abb.19A/B). So betrug die gemessene ALAT-Aktivität der

Kontrolle  $70 \pm 13,5$  U/l, wohingegen in den Proben der mit Mikrokapseln infundierten Tiere bereits Werte von  $106,1 \pm 24,7$  U/l bestimmt wurden. Mit  $86 \pm 14,3$  U/l (NaCl) und  $193,7 \pm 47,9$  U/l (PEG-PLGA+PFD) zeigte sich ein noch deutlicherer Unterschied in den gemessenen ASAT-Aktivitäten zu diesem Zeitpunkt. Im weiteren Versuchsverlauf erhöhten sich die Aktivitäten der zwei Enzyme in der Mikrokapselversuchsgruppe weiterhin, so dass am Versuchsende signifikant erhöhte Werte von  $240,3 \pm 72,3$  U/l (ALAT) und  $509,9 \pm 141,4$  U/l (ASAT) bestimmt wurden.

Ebenfalls signifikant erhöhte Werte ergaben die Auswertungen der LDH-Enzymaktivität der mit PEG-PLGA+PFD-Mikrokapseln infundierten Tiere (Abb.19C). Bereits 90 min nach dem Start der Infusion stieg die LDH-Aktivität mit  $574 \pm 149$  U/l deutlich über das Konzentrationsniveau der NaCl-Kontrollgruppe ( $70,5 \pm 19,1$  U/l) hinaus an. Ab diesem Zeitpunkt stiegen die gemessenen Werte nahezu linear an, so dass am Versuchsende eine mit  $1939,1 \pm 413,2$  U/l gegenüber der Kontrolle rund 24fach erhöhte Enzymaktivität in der Mikrokapselversuchsgruppe bestimmt wurde.

Die Analyse der CK-NAC zeigte bei den Tieren der PEG-PLGA+PFD-Mikrokapselgruppe 90 min nach der Infusion mit  $686,3 \pm 159,3$  U/l einen signifikanten Anstieg der Enzymaktivität im Vergleich mit der NaCl-Kontrollgruppe ( $172,3 \pm 31,2$  U/l; Abb.19D). Die CK-NAC-Aktivität im Plasma stieg im weiteren Versuchsverlauf weiterhin signifikant an, so dass am Versuchsende mit  $1170,5 \pm 115,3$  U/l gegenüber der Kontrollgruppe eine rund 5mal so hohe Aktivität gemessen wurde.

Die Nitritkonzentration einer jeden Versuchsgruppe wurde aufgrund des hohen benötigten Probenvolumens lediglich final 90, 150 bzw. 270 min nach dem Infusionsstart bestimmt. Bei der Auswertung zeigten sich zum Teil signifikante Unterschiede zwischen der NaCl-Kontrollgruppe und den mit PEG-PLGA+PFD-Mikrokapseln infundierten Tieren (Abb.20).



**Abbildung 20: Einfluss der i.v. Applikation von kapselfreier PVA-Lösung und PFD-gefüllten PEG-PLGA-Mikrokapseln auf die Nitritkonzentration im Blutplasma.** Die narkotisierten und analgesiierten Tiere erhielten während einer 30-minütigen Infusionsphase 20 ml/kg KGW·h entweder kapselfreie 0,25 %ige PVA-Lösung (PVA) oder PFD-gefüllte Mikrokapseln (PEG-PLGA+PFD). Tiere der Kontrollgruppe (NaCl) wurden mit dem gleichen Volumen isotoner 0,9 %iger Kochsalzlösung infundiert. Die Nitritkonzentration wurde im finalen Blutplasma 90, 150 bzw. 270 min nach dem Start der versuchsabhängigen Infusionslösung bestimmt. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n=3$  (NaCl),  $n=3$  (PVA),  $n_{90\text{min}}=4$ ,  $n_{150\text{min}}=4$ ,  $n_{270\text{min}}=6$  (PEG-PLGA+PFD). \* $p < 0,05$  (gegenüber NaCl-Kontrolle).

Abhängig von dem Zeitpunkt der Nitritmessung (90, 150 oder 270 min nach Infusionsstart) zeigten sich zum Teil signifikante Unterschiede zwischen der jeweiligen NaCl-Kontrollgruppe und den Versuchsgruppen, die eine Infusion von PEG-PLGA+PFD-Mikrokapseln erhielten. Die Nitritkonzentration der Kontrolle blieb mit  $43,17 \pm 7,85 \mu\text{M}$  (90 min),  $39,33 \pm 2,18 \mu\text{M}$  (150 min) bzw.  $30,22 \pm 0,18 \mu\text{M}$  (270 min) unabhängig von dem jeweiligen Zeitpunkt der Nitritmessung auf einem relativ konstanten Niveau. Analog dazu verhielt sich die Nitritkonzentration in den Proben der mit PVA infundierten Tiere. Mit  $28,50 \pm 11,48 \mu\text{M}$  nach 90 min und  $24,33 \pm 6,26 \mu\text{M}$  nach 150 min lagen die Konzentrationen sogar noch unter denen der NaCl-Kontrolle. Am Versuchsende nach 270 min lagen die Werte der Kontroll- und PVA-Gruppe ( $28,50 \pm 5,49 \mu\text{M}$ ) in demselben Konzentrationsbereich.

Auf einem zum Teil signifikant höheren Konzentrationsniveau zeigten sich dagegen die Werte der Tiere, die eine Infusion von PEG-PLGA+PFD-Mikrokapseln erhielten. In der Versuchsgruppe, deren Beobachtungszeitraum 90 min betrug, wurde mit  $55,58 \pm 8,90 \mu\text{M}$  bereits eine, im Vergleich zur Kontrolle, erhöhte Nitritkonzentration gemessen. Nach einer Versuchsdauer von 150 min zeigte sich ebenfalls ein leicht erhöhter Nitritwert



( $54,83 \pm 14,14 \mu\text{M}$ ). Ein signifikanter Anstieg auf  $65,28 \pm 6,80 \mu\text{M}$  wurde nach 270 min deutlich.

### 3.2.4 Einfluss von i.v. appliziertem PVA bzw. mit Perfluorodekalin-gefüllten (PEG-PLGA+PFD) Mikrokapseln auf Gerinnungsparameter

Die Bestimmung der Gerinnungsparameter CT (*coagulation time*), CFT (*clot formation time*), MCF (*maximum clot firmness*),  $\alpha$ -Winkel und Lyse-Index nach 60 min (LI60) wurde in den gleichen Abnahmeintervallen durchgeführt wie die Messungen, die mit dem Blutgasanalysegerät erfolgten. Die Evaluation der viskoelastischen Eigenschaften des Blutes mit Hilfe eines ROTEM® Vollblut-Hämostase-Systems zeigte lediglich bei der CFT 150 min und 270 min nach dem Start einer Infusion von PEG-PLGA+PFD-Mikrokapseln einen signifikanten Unterschied im Vergleich mit der NaCl-Kontrollgruppe (Tab.8).

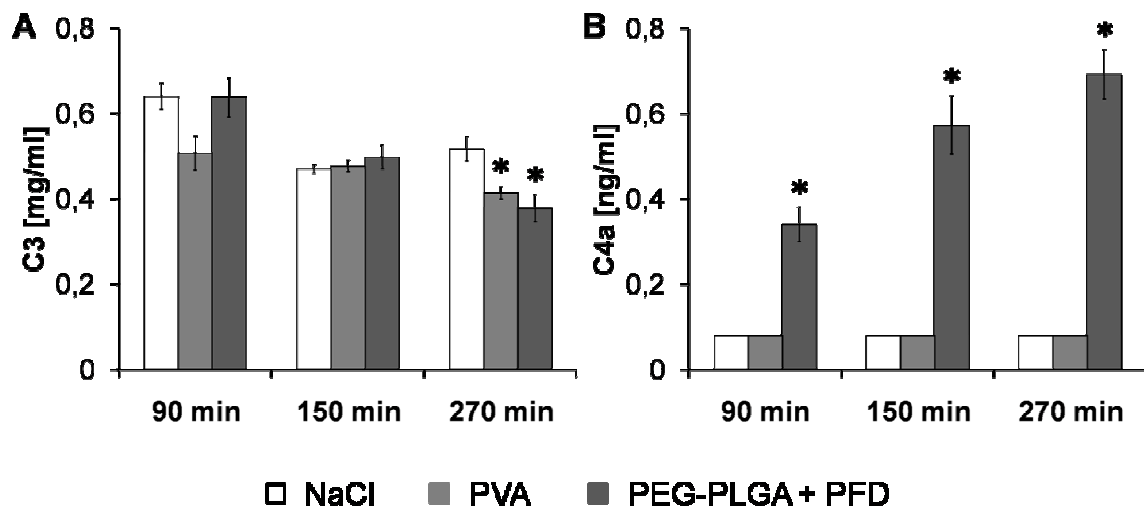
**Tabelle 8: Einfluss der i.v. Applikation von kapselfreier PVA-Lösung und PFD-gefüllten PEG-PLGA-Mikrokapseln auf Gerinnungsparameter.** Dargestellt sind die CT (*coagulation time*), CFT (*clot formation time*), MCF (*maximum clot firmness*),  $\alpha$ -Winkel und Lyse-Index-60 (LI60) jeweils beginnend vor dem Start der Applikation (0 min) der versuchsabhängigen Infusionslösung sowie 90 min, 150 min, 270 min danach. Alle Parameter wurden in Citratblut bestimmt. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM, n=3 (NaCl), n=3 (PVA), n<sub>90min</sub>=4, n<sub>150min</sub>=4, n<sub>270min</sub>=6 (PEG-PLGA+PFD). \*p < 0,05 (gegenüber NaCl-Kontrolle).

Gruppe	0 min (vor Infusion)	90 min nach Infusionsstart	150 min nach Infusionsstart	270 min nach Infusionsstart
CT (sek)				
NaCl	429,2 $\pm$ 43,22	323,3 $\pm$ 105,61	376,3 $\pm$ 67,10	358,0 $\pm$ 81,56
PVA	468,2 $\pm$ 5,33	384,7 $\pm$ 31,13	285,3 $\pm$ 17,52	315,3 $\pm$ 32,75
PEG-PLGA+PFD	504,9 $\pm$ 15,43	278,8 $\pm$ 44,91	237,0 $\pm$ 16,00	233,3 $\pm$ 19,27
CFT (sek)				
NaCl	109,1 $\pm$ 12,66	93,7 $\pm$ 34,37	92,0 $\pm$ 11,55	100,3 $\pm$ 24,11
PVA	130,8 $\pm$ 2,77	93,7 $\pm$ 1,86	67,7 $\pm$ 10,27	69,0 $\pm$ 14,42
PEG-PLGA+PFD	140,9 $\pm$ 5,92	42,8 $\pm$ 5,34	33,0 $\pm$ 1,00*	53,3 $\pm$ 7,72*
MCF (mm)				
NaCl	69,0 $\pm$ 1,46	68,7 $\pm$ 1,86	72,3 $\pm$ 2,60	69,3 $\pm$ 4,18
PVA	67,9 $\pm$ 0,94	69,7 $\pm$ 0,33	73,0 $\pm$ 2,08	71,3 $\pm$ 0,88
PEG-PLGA+PFD	67,7 $\pm$ 0,83	74,3 $\pm$ 1,65	75,5 $\pm$ 1,50	71,5 $\pm$ 1,69
$\alpha$ -Winkel (°)				
NaCl	70,2 $\pm$ 2,17	72,7 $\pm$ 5,46	73,0 $\pm$ 2,31	72,7 $\pm$ 4,06
PVA	67,0 $\pm$ 0,22	72,3 $\pm$ 0,33	77,0 $\pm$ 1,53	77,3 $\pm$ 2,40
PEG-PLGA+PFD	65,4 $\pm$ 1,00	81,8 $\pm$ 1,03	83,5 $\pm$ 0,50	79,3 $\pm$ 1,52
LI60 (%)				
NaCl	95,0 $\pm$ 0,38	95,3 $\pm$ 0,33	96,3 $\pm$ 0,33	96,3 $\pm$ 0,33
PVA	95,1 $\pm$ 0,78	96,3 $\pm$ 0,88	96,7 $\pm$ 1,20	95,0 $\pm$ 1,15
PEG-PLGA+PFD	95,9 $\pm$ 0,32	95,0 $\pm$ 0,91	97,5 $\pm$ 0,50	98,6 $\pm$ 0,93

Neben der CFT wurde die CT als Maß für die Aktivierungszeit der Thrombingeneration bestimmt. Allerdings unterschieden sich die Werte unabhängig von der eingesetzten Infusionslösung (PVA-Lösung oder PEG-PLGA+PFD-Mikrokapseln) und dem jeweiligen Versuchsende nach entweder 90 min, 150 min oder 270 min nicht essentiell von denjenigen der NaCl-Kontrollgruppe. Analog dazu verhielten sich die Messwerte zur MCF,  $\alpha$ -Winkel und zum LI-60.

### 3.2.5 Einfluss von i.v. appliziertem PVA bzw. mit Perfluordekalin-gefüllten (PEG-PLGA+PFD) Mikrokapseln auf Komplementaktivierung und Zytokinfreisetzung

Die Komplementfaktoren und Zytokine wurden aufgrund des hohen benötigten Probenvolumens lediglich final 90, 150 und 270 min nach dem Infusionsstart bestimmt. Die Analyse des Einflusses der i.v. Applikation von kapselfreier PVA-Lösung und PEG-PLGA+PFD-Mikrokapseln auf die Aktivierung der Komplementfaktoren 3 (C3) und 4a (C4a) ergab einen, von der Versuchsdauer unabhängigen, signifikanten Anstieg von C4a im Plasma der Tiere, die eine Infusion der Mikrokapseln erhielten (Abb.21). Die Interleukine 1 $\alpha$ -, 1 $\beta$ -, 5-, 6- und 10 sowie der Tumornekrosefaktor- $\alpha$  lagen für die mit Mikrokapseln infundierten Tiere signifikant über der NaCl-Kontrollgruppe (Abb.22; Tab.9).

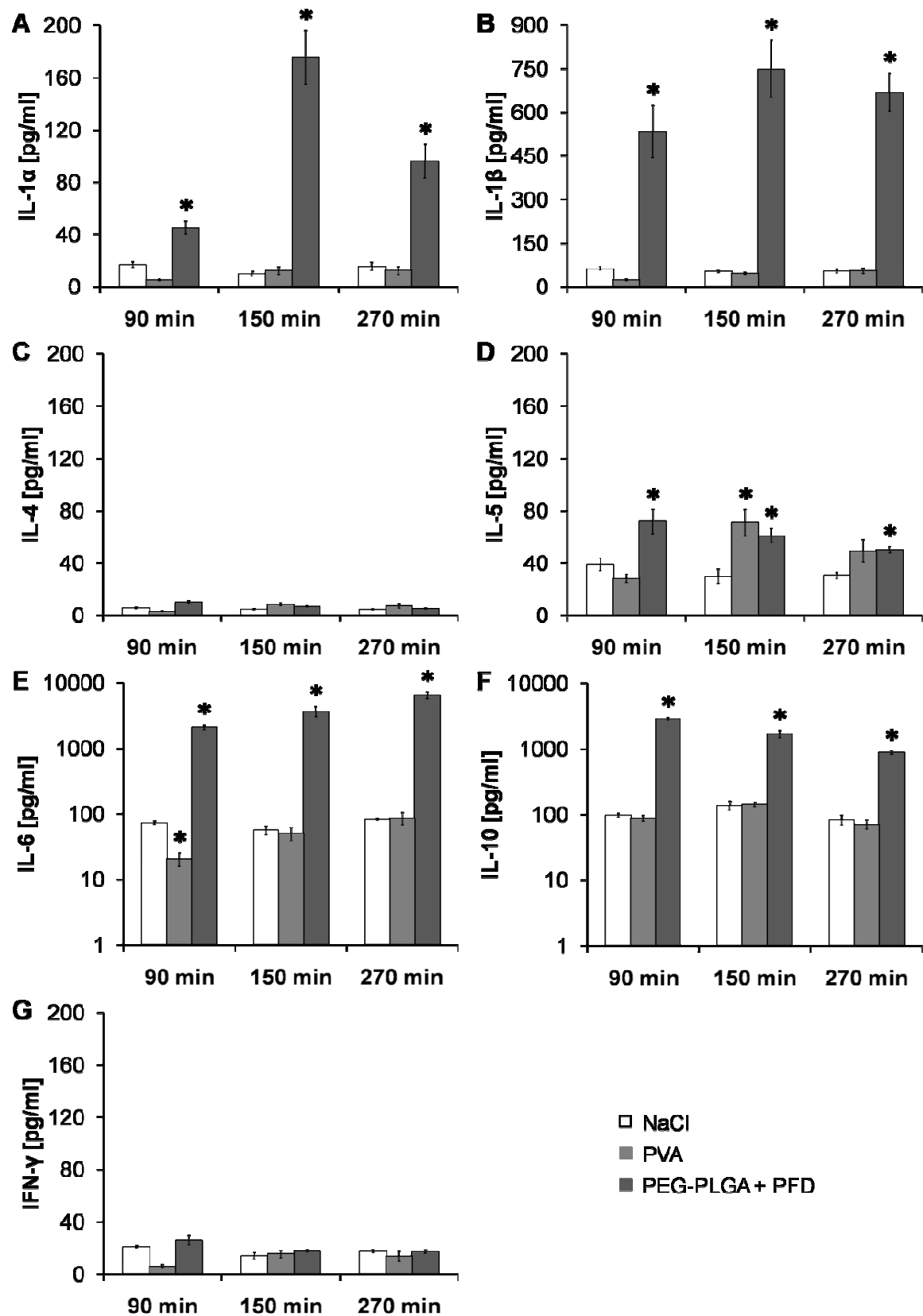


**Abbildung 21: Einfluss der i.v. Applikation von kapselfreier PVA-Lösung und PFD-gefüllten Mikrokapseln auf die Komplementaktivierung.** Die narkotisierten und analgesiarten Tiere erhielten während einer 30-minütigen Infusionsphase 20 ml/kg KGW·h entweder kapselfreie 0,25 %ige PVA-Lösung (PVA) oder PFD-gefüllte Mikrokapseln (PEG-PLGA+PFD). Tiere der Kontrollgruppe (NaCl) wurden mit dem gleichen Volumen isotoner 0,9 %iger Kochsalzlösung infundiert. Die Komplementaktivierung wurde am Versuchsende in heparinisiertem Blutplasma bestimmt. Dargestellt ist die Aktivierung der Komplementfaktoren (A) 3 (C3) und (B) 4a (C4a) jeweils am Versuchsende (90, 150 und 270 min nach dem Start der Applikation der versuchsabhängigen Infusionslösung). Die gezeigten Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM, n=3 (NaCl), n=3 (PVA), n<sub>90min</sub>=4, n<sub>150min</sub>=4, n<sub>270min</sub>=6 (PEG-PLGA+PFD). \*p < 0,05 (gegenüber NaCl-Kontrolle).

Die intravenöse Applikation von NaCl ergab unabhängig vom Messzeitpunkt in der Kontrollgruppe keine Aktivitätsveränderungen des Komplementfaktors 3 (Abb.21A). So betrug die C3 Konzentration nach 90 min  $0,64 \pm 0,03$  mg/ml, nach 150 min

0,47 ± 0,01 mg/ml und nach 270 min 0,52 ± 0,03 mg/ml. Die gemessenen Aktivitäten im Plasma der mit PVA infundierten Tiere unterschieden sich nach 90 min (0,51 ± 0,04 mg/ml) und 150 min (0,48 ± 0,01 mg/ml) im Vergleich mit der NaCl-Kontrollgruppe nicht signifikant. Nach 270 min lag die Konzentration von Faktor 3 in der PVA-Gruppe mit 0,41 ± 0,01 mg/ml signifikant unter dem für die Kontrolle bestimmten Wert. Analog dazu zeigte sich die Plasmaaktivität von C3 in den Tieren die eine Infusion der Mikrokapseln erhielten. Der Test auf Signifikanz ergab nach 90 min mit 0,64 ± 0,05 mg/ml und nach 150 min mit 0,50 ± 0,03 mg/ml keine wesentlichen Konzentrationsveränderungen. Lediglich nach einer Versuchsdauer von 270 min zeigte sich ein zur Kontrolle signifikant erniedrigter Wert von 0,38 ± 0,03 mg/ml.

Eine Infusion von NaCl und kapselfreier PVA-Lösung löste zu keinem der drei Zeitpunkte eine Aktivitätserhöhung des Komplementfaktors C4a aus (Abb.21B). Mit gemessenen Werten von <0,08 ng/ml lagen die Konzentrationen unter der testspezifischen Nachweisgrenze. Unabhängig von dem jeweiligen Messzeitpunkt zeigten die Tiere die eine Mikrokapselinfusion erhielten mit 0,34 ± 0,04 ng/ml (90 min), 0,57 ± 0,07 ng/ml (150 min) und 0,69 ± 0,06 ng/ml (270 min) gegenüber der NaCl-Kontrolle signifikant erhöhte C4a Plasmakonzentrationen.



**Abbildung 22: Einfluss der i.v. Applikation von kapselfreier PVA-Lösung und PFD-gefüllten Mikrokapseln auf die Zytokinfreisetzung.** Die narkotisierten und analgesi-erten Tiere erhielten während einer 30-minütigen Infusionsphase 20 ml/kg KGW·h entweder kapselfreie 0,25 %ige PVA-Lösung (PVA) oder PFD-gefüllte Mikrokapseln (PEG-PLGA+PFD). Tiere der Kontrollgruppe (NaCl) wurden mit dem gleichen Volumen isotoner 0,9 %iger Kochsalzlösung infundiert. Die Zytokinfreisetzung wurde am Versuchsende in heparinisiertem Blutplasma bestimmt. Dargestellt ist die Freisetzung der Zytokine (A) Interleukin-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), (B) Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), (C) Interleukin-4 (IL-4), (D) Interleukin-5 (IL-5), (E) Interleukin-6 (IL-6), (F) Interleukin-10 (IL-10) und (G) Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) jeweils am Versuchsende (90, 150 und 270 min nach dem Start der Applikation der versuchsabhängigen Infusionslösung). Die gezeigten Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM, n=3 (NaCl), n=3 (PVA), n<sub>90min</sub>=4, n<sub>150min</sub>=4, n<sub>270min</sub>=6 (PEG-PLGA+PFD). \*p < 0,05 (gegenüber NaCl-Kontrolle).

IL-1 $\alpha$  stieg, nach einer Infusion von PEG-PLGA+PFD-Mikrokapseln, zu allen Messzeitpunkten signifikant über das Niveau der NaCl-Kontrollgruppe hinaus an. So lag die IL-1 $\alpha$  Konzentration 90 min nach dem Infusionsstart mit  $45,26 \pm 5,14$  pg/ml bereits mehr als doppelt so hoch über dem Wert der NaCl-Kontrolle ( $16,99 \pm 2,02$  pg/ml; Abb.22A). Nach einer Versuchsdauer von 150 min wurde die mit  $175,37 \pm 20,69$  pg/ml höchste IL-1 $\alpha$  Konzentration gemessen, die damit ebenfalls signifikant gegenüber dem Messwert der Kontrolle ( $9,83 \pm 1,84$  pg/ml) erhöht war. Eine Beobachtungsphase von 270 min nach dem Start der Infusion ergab für die NaCl-Kontrollgruppe mit den beiden anderen Messzeitpunkten vergleichbare Messungen von  $15,50 \pm 3,22$  pg/ml. Ebenso lag zu diesem Zeitpunkt die IL-1 $\alpha$ -Konzentration der mit Mikrokapseln infundierten Tiere mit  $95,95 \pm 13,21$  pg/ml signifikant über dem Niveau der Kontrolle. Die Konzentration im Blutplasma der Tiere, die eine Infusion von PVA (90 min:  $5,24 \pm 0,65$  pg/ml; 150 min:  $12,24 \pm 3,02$  pg/ml; 270 min:  $12,45 \pm 3,22$  pg/ml) erhielten, lagen zu allen Zeitpunkten in Bereichen der NaCl-Kontrolle.

Einen ähnlichen Verlauf erbrachte die Analyse der IL-1 $\beta$  Konzentration im Plasma der drei verschiedenen Versuchsgruppen (Abb.22B). Unabhängig von dem jeweiligen Messzeitpunkt lag die Freisetzung von IL-1 $\beta$  mit  $63,05 \pm 7,31$  pg/ml (90 min),  $52,81 \pm 5,28$  pg/ml (150 min) bzw.  $53,82 \pm 7,09$  pg/ml (270 min) für die NaCl-Kontrollgruppe in einem niedrigen Konzentrationsbereich. Mit Werten von  $533,26 \pm 90,87$  pg/ml nach 90 min,  $748,33 \pm 97,91$  pg/ml nach 150 min und  $668,58 \pm 65,43$  pg/ml nach 270 min lagen die Plasmakonzentrationen in den Proben der mit PEG-PLGA+PFD-Mikrokapseln infundierten Tiere signifikant über dem Level der NaCl-Kontrolle. Wie schon bei der Bestimmung von IL-1 $\alpha$  wurden für IL-1 $\beta$  in der PVA-Versuchsgruppe mit  $23,57 \pm 2,78$  pg/ml (90 min),  $45,40 \pm 4,09$  pg/ml (150 min) bzw.  $54,73 \pm 10,83$  pg/ml (270 min) Konzentrationen im Bereich der Kontrollgruppe gemessen.

Unabhängig von den jeweiligen Messzeitpunkten zeigten sich sowohl bei der Analyse der IL-4- als auch IFN- $\gamma$ -Plasmakonzentration keine wesentlichen Veränderungen der mit Mikrokapseln bzw. PVA infundierten Tiere gegenüber der NaCl-Kontrolle (Abb.22C/G).

Mit  $38,96 \pm 4,79$  pg/ml (90 min),  $29,69 \pm 5,67$  pg/ml (150 min) und  $30,47 \pm 2,45$  pg/ml (270 min) lagen die IL-5 Plasmakonzentrationen in der NaCl-Kontrollgruppe weitestgehend konstant in einem niedrigen Konzentrationsbereich (Abb.22D). Nach 90 min lag der Wert der PVA-Versuchsgruppe mit  $28,14 \pm 3,53$  pg/ml leicht unter dem Niveau der NaCl-Kontrolle. Im Gegensatz dazu zeigte sich mit einer gemessenen Konzentration von  $71,71 \pm 9,45$  pg/ml für die mit PEG-PLGA+PFD-Mikrokapseln infundierten Tiere eine gegenüber der Kontrolle signifikant erhöhte IL-5 Freisetzung. Obwohl die Konzentration mit andauernder Versuchsdauer wieder abnahm, blieb sie gegenüber der NaCl-Kontrollgruppe signifikant erhöht (150 min:  $60,94 \pm 5,42$  pg/ml; 270 min:  $50,17 \pm 2,35$  pg/ml). Die Infusion von PVA führte nach 150 min mit  $70,88 \pm 10,13$  pg/ml zu einem im Vergleich mit Kontrolle signifikant erhöhten Messwert, wohingegen sich die erhöhte Konzentration von  $49,06 \pm 8,63$  pg/ml als nicht signifikant zeigte.

Im Falle von IL-6 führte die Infusion von PEG-PLGA+PFD-Mikrokapseln zu einem erhöhten Anstieg des Zytokins 90 min, 150 min und 270 min nach dem Start der Infusion (Abb.22E). Dieser Effekt war zu allen drei Zeitpunkten signifikant für PEG-PLGA+PFD (90 min:  $2114,30 \pm 182,46$  pg/ml; 150 min:  $3695,72 \pm 686,52$  pg/ml; 270 min:  $6457,40 \pm 809,27$  pg/ml) gegenüber der NaCl-Kontrollgruppe (90 min:  $74,12 \pm 4,28$  pg/ml; 150 min:  $56,67 \pm 9,22$  pg/ml; 270 min:  $82,12 \pm 2,52$  pg/ml). Mit  $20,46 \pm 4,89$  pg/ml lag die IL-6 Plasmakonzentration nach einer PVA-Infusion und einer Versuchsdauer von 90 min signifikant unter dem NaCl-Kontrollniveau. Eine Verlängerung der Versuchszeit auf 150 min und 270 min zeigte mit  $50,47 \pm 11,69$  pg/ml bzw.  $86,01 \pm 17,69$  pg/ml Konzentrationslevel im Bereich der NaCl-Kontrolle.

Die Freisetzung des Zytokins IL-10 verlief in der NaCl-Kontrollgruppe und der PVA-Versuchsgruppe nahezu deckungsgleich (Abb.22F). Im Gegensatz dazu ergab die Analyse der IL-10 Konzentration im Plasma, unabhängig vom Versuchsende, nach einer Infusion der Mikrokapseln mit  $2877,17 \pm 172,01$  pg/ml (90 min),  $1698,71 \pm 235,46$  pg/ml (150 min) und  $881,69 \pm 57,21$  pg/ml (270 min) gegenüber der NaCl-Kontrolle (um 100 pg/ml) signifikant erhöhte Werte.

Im Falle von TNF- $\alpha$  führte die Infusion von PEG-PLGA+PFD-Mikrokapseln zu einem Anstieg des Zytokins 90 min, 150 min und 270 min nach dem Start der Infusion (Tab.9). Dieser Effekt war zu allen drei Zeitpunkten signifikant für PEG-PLGA+PFD (90 min:  $988,7 \pm 65,05$  pg/ml; 150 min:  $969,8 \pm 176,65$  pg/ml; 270 min:  $722,0 \pm 56,78$  pg/ml) gegenüber der NaCl-Kontrollgruppe (90 min:  $6,6 \pm 1,16$  pg/ml; 150 min:  $6,3 \pm 0,72$  pg/ml;

270 min:  $4,9 \pm 1,92$  pg/ml). Die TNF- $\alpha$  Plasmakonzentration nach PVA-Infusion lag unabhängig von der Versuchsdauer im Bereich der NaCl-Kontrollgruppe.

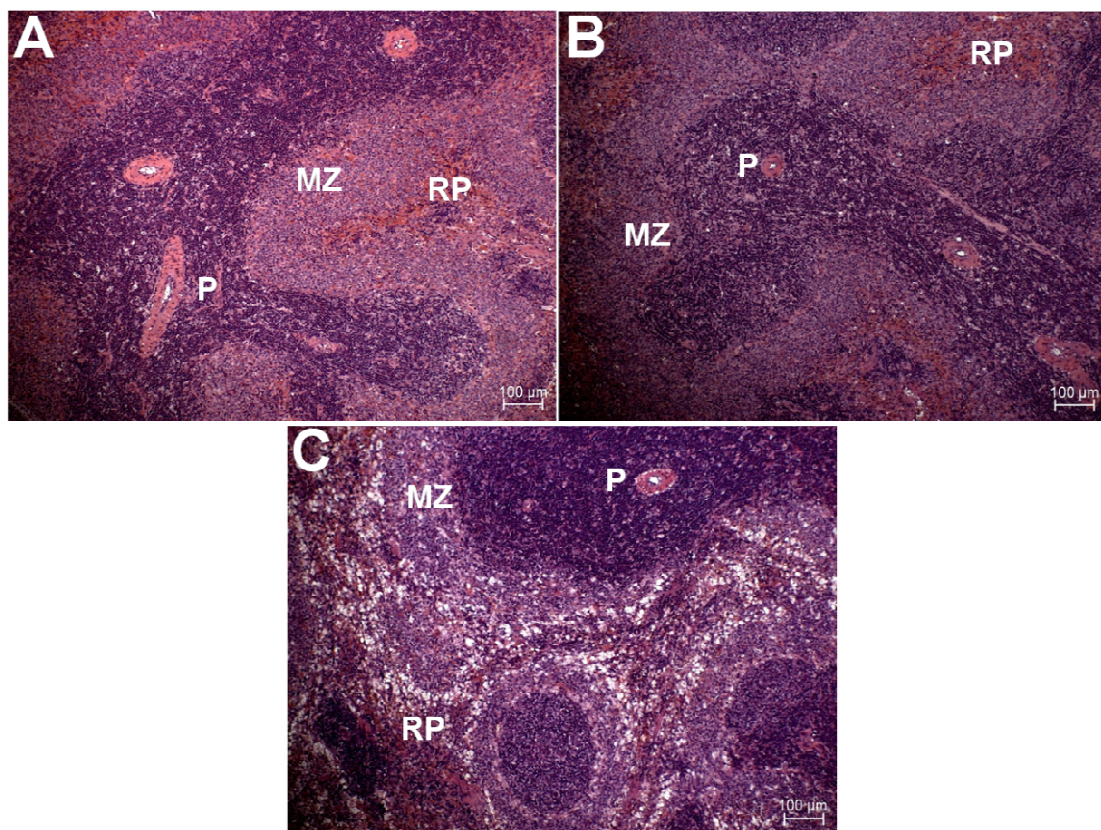
**Tabelle 9: Einfluss der i.v. Applikation von kapselfreier PVA-Lösung und PFD-gefüllten Mikrokapseln auf die Freisetzung von Tumornekrosefaktor- $\alpha$ .** Dargestellt ist die Tumornekrosefaktor- $\alpha$ -Konzentration (TNF- $\alpha$ ) am Versuchsende (90, 150 und 270 min nach dem Start der Applikation der versuchsabhängigen Infusionslösung). Die gezeigten Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM, n=3 (NaCl), n=3 (PVA),  $n_{90\text{min}}=4$ ,  $n_{150\text{min}}=4$ ,  $n_{270\text{min}}=6$  (PEG-PLGA+PFD). \*p < 0,05 (gegenüber NaCl-Kontrolle).

Gruppe	90 min nach Infusionsstart	150 min nach Infusionsstart	270 min nach Infusionsstart
TNF- $\alpha$ [pg/ml]			
NaCl	$6,6 \pm 1,16$	$6,3 \pm 0,72$	$4,9 \pm 1,92$
PVA	$0,5 \pm 0,00$	$0,3 \pm 0,14$	$6,5 \pm 0,32$
PEG-PLGA+PFD	$988,7 \pm 65,05^*$	$969,8 \pm 176,65^*$	$722,0 \pm 56,78^*$



### 3.2.6 Einfluss von *i.v.* appliziertem PVA bzw. mit Perfluorodekalin-gefüllten (PEG-PLGA+PFD) Mikrokapseln auf histologische Veränderungen der Organstrukturen

Die in 2.12 beschriebene histologische Evaluation verschiedener Organe zur Beurteilung des Einflusses einer Infusion von PVA und PEG-PLGA+PFD-Mikrokapseln zeigte zum Teil ausgeprägte Organschädigungen an.



**Abbildung 23: Einfluss der *i.v.* Applikation von kapselfreier PVA-Lösung und PFD-gefüllten Mikrokapseln auf die Histologie der Milz.** Die narkotisierten und analgesiierten Tiere erhielten während einer 30-minütigen Infusionsphase 20 ml/kg KGW·h entweder kapselfreie 0,25 %ige PVA-Lösung (PVA) oder PFD-gefüllte Mikrokapseln (PEG-PLGA+PFD). Tiere der Kontrollgruppe (NaCl) wurden mit dem gleichen Volumen isotoner 0,9 %iger Kochsalzlösung infundiert. Exemplarisch dargestellt sind Hämatoxylin-Eosin(HE)-gefärbte Milzpräparate nach Infusion von (A) NaCl, (B) PVA und (C) PEG-PLGA+PFD 270 min nach dem Start der Infusion. HE-Färbung; Originalvergrößerung: 10x. Die gezeigten Fotos sind repräsentativ von n=3 (NaCl), n=3 (PVA) und n=6 (PEG-PLGA+PFD). Abkürzungen: P=Periarterielle Lymphscheide; MZ=Marginalzone; RP=rote Pulpa.

Die Infusion von PEG-PLGA+PFD-Mikrokapseln verursachte deutliche histologische Veränderungen in der Milz und Leber (Abb.23: exemplarische Darstellung der Milz; Leber nicht gezeigt). Die lichtmikroskopische Untersuchung der Hämatoxylin-Eosin (HE)-gefärbten Milzpräparate, mit dem Schwerpunkt der Beurteilung der Intaktheit von weißer und roter Pulpa, fiel für die Versuchsgruppen der mit NaCl- und PVA- infundierten Tiere ohne pathologischen Befund aus (Abb.23A/B). Sowohl die weiße Pulpa, bestehend aus der periarteriellen Lymphscheide, Follikeln und Marginalzone, als auch die rote Pulpa zeigten gleichmäßig gestaltete Gewebestrukturen. Im Gegensatz dazu ließ sich die rote Pulpa in den Milzpräparaten der PEG-PLGA+PFD-Versuchsgruppe praktisch nicht mehr als solche erkennen (Abb.23C). Die Gewebestruktur erschien nahezu aufgelöst und von großlumigen Hohlräumen durchzogen. Auch die Marginalzone der weißen Pulpa zeigte unter dem Lichtmikroskop keine vollkommen intakte Gestaltung mehr. Die hier beschriebenen histopathologischen Veränderungen konnten in derselben Intensität auch in den Milzpräparaten beobachtet werden, die nach 90 min oder 150 min angefertigt wurden (Bilder nicht gezeigt).

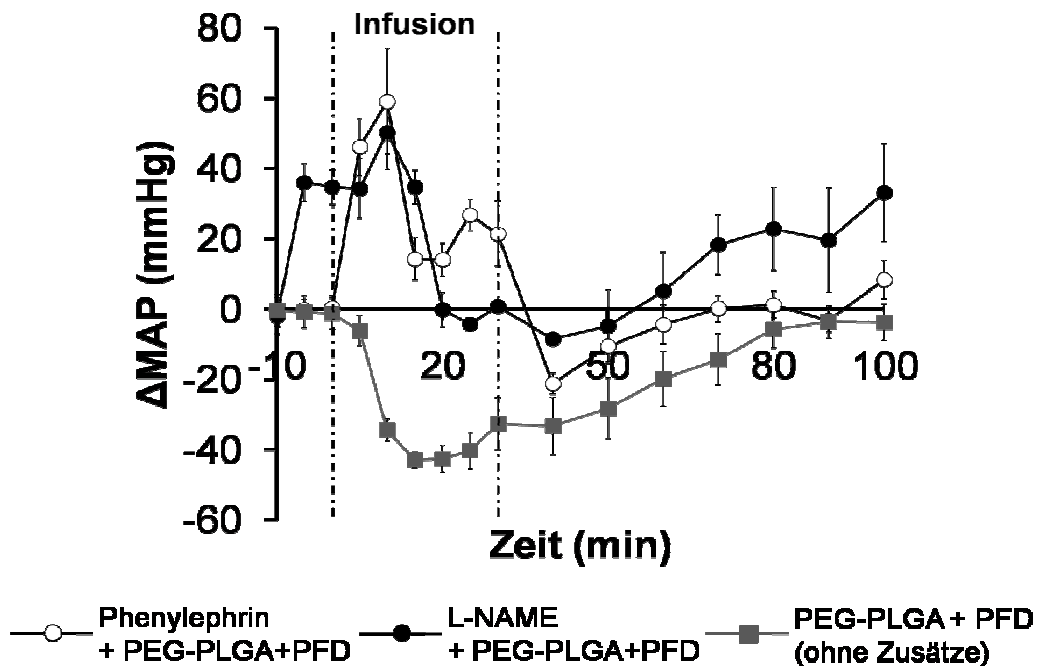
Die histologische Beurteilung der HE-gefärbten Schnitte der Leber auf Erythrozyten in den Sinusoiden, eingewanderte Granulozyten und zytosolische Vakuolen an den Hepatozyten konnte aufgrund der starken Organschädigung nur zum Teil durchgeführt werden (Bilder nicht gezeigt). Ähnlich wie bei der Milz zeigten die Leberpräparate aus der PEG-PLGA+PFD-Versuchsgruppe nahezu aufgelöste Gewebestrukturen; unabhängig von dem jeweiligen Versuchsende. Intakte Gewebeareale zeigten weder Erythrozyten in den Sinusoiden noch eingewanderte Granulozyten oder zytosolische Vakuolen an den Hepatozyten.

Die bereits in 3.1.6 beschriebenen makroskopisch sichtbaren Petechien in der Außenwand des vierten Dünndarmsegments wurden auch in der zweiten Versuchsserie beobachtet (Daten/Bilder nicht gezeigt). Eine daraufhin weiterführende histologische Beurteilung dieses Segments nach dem Bewertungsscore von Chiu und Park (2.12) blieb in allen drei Versuchsgruppen ohne pathologischen Befund. Auch die mikroskopische Analyse der äußeren Darmwand ergab keine histologischen Veränderungen dieses Segments.

Die mikroskopische Untersuchung der HE-gefärbten Lungenpräparate auf durch Einblutungen oder Wassereinträge hervorgerufene Schwellungen der Alveolarwand, ergab ebenfalls keine erkennbaren histopathologischen Veränderungen (Daten/Bilder nicht gezeigt).

### 3.3 Einfluss von N<sub>ω</sub>-Nitro-L-argininmethylester und Phenylephrin auf die durch PEG-PLGA+PFD-Mikrokapseln verursachte Hypotension (Evaluierungsreihe)

Bei der Auswertung des Einflusses von N<sub>ω</sub>-Nitro-L-argininmethylester (L-NAME) und Phenylephrin auf die durch PEG-PLGA+PFD-Mikrokapseln verursachte Hypotension, zeigten sich für beide Substanzen vorübergehend stabilisierende Effekte auf den MAP (Abb.24).



**Abbildung 24:** Einfluss von N<sub>ω</sub>-Nitro-L-argininmethylester (L-NAME) und Phenylephrin auf die Hypotension während einer PEG-PLGA+PFD-Mikrokapselinfusion. Die narkotisierten und analgesiierten Tiere erhielten während einer 30-minütigen Infusionsphase je 20 ml/kg KGW·h PEG-PLGA+PFD-Mikrokapseln (ohne weitere Zusätze; Daten aus Serie 2) (■), PEG-PLGA+PFD-Mikrokapseln zusammen mit 3 µg/kg KGW·min Phenylephrin (○) oder in Kombination mit einer Bolusgabe von 4 mg/kg KGW L-NAME 5 min vor Infusionsstart der Mikrokapseln (●). Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± SEM, pro Gruppe n=3 (L-NAME und Phenylephrin) bzw. n=6 (PEG-PLGA+PFD ohne Zusätze). Nicht sichtbare SEM-Werte sind durch die Symbole verdeckt.

Wie bereits für Serie 2 (3.2) beschrieben fiel der MAP der Tiere, die eine Infusion von PEG-PLGA+PFD-Mikrokapseln erhielten 15 min nach dem Infusionsstart deutlich ab und lag  $43 \pm 2$  mmHg unter dem Niveau des durchschnittlichen Ausgangsblutdrucks (MAP-Basislinie) (Abb.24).

Enthielt die PEG-PLGA+PFD-Mikrokapselinfusion zusätzlich Phenylephrin, so stieg der MAP unmittelbar nach Infusionsstart um  $46 \pm 8$  mmHg und nach 10 min um weitere 13 mmHg über die Basislinie an. Nach 15 min fiel der MAP auf 14 mmHg über der

Basislinie ab. Bis zum Infusionsende stieg der MAP der Phenylephringruppe  $21 \pm 9$  mmHg über die Basislinie an. Unmittelbar nach Infusionsende fiel der MAP ab, so dass er nach 40 min  $21 \pm 3$  mmHg unter dem Niveau der Basislinie lag. Im weiteren Versuchsverlauf näherte sich der MAP wieder der Basislinie an und betrug nach 100 min nahezu wieder Ausgangsniveau ( $8 \pm 5$  mmHg).

Erhielten die Tiere 5 min vor dem Start (x-Achse  $t = -5$  min) der PEG-PLGA+PFD-Mikrokapselinfusion einen L-NAME Bolus, so wurde zu Beginn der Infusion ein MAP von  $35 \pm 5$  mmHg über Basislinienniveau gemessen. Nach Infusionsstart stieg der MAP weiter an (10 min:  $50 \pm 11$  mmHg), fiel dann jedoch kontinuierlich ab, so dass er 25 min nach dem Infusionsstart  $4 \pm 2$  mmHg unter dem Ausgangsniveau lag. Zunächst fiel der MAP weiter ab (40 min:  $9 \pm 1$  mmHg unter Basislinie), stieg allerdings im weiteren Versuchsverlauf kontinuierlich an, so dass er am Versuchsende nach 100 min  $33 \pm 14$  mmHg über dem Niveau der Basislinie lag.

## 4. DISKUSSION

Die intravasale Halbwertszeit von PEG-PLGA- bzw. PEG-PLGA+PFD-Mikrokapseln unterlag einer dosisunabhängigen Kinetik erster Ordnung, wobei die PFD-gefüllten Mikrokapseln mit rund einer Stunde eine beachtliche und im Vergleich mit den soliden Kapseln längere Halbwertszeit aufwiesen. Die Infusion von PEG-PLGA- bzw. PEG-PLGA+PFD-Mikrokapseln löste massive Gewebeschädigungen, v.a. der Leber und Milz aus, u.a. indiziert durch einen gegenüber der NaCl-Kontrolle signifikanten Anstieg der Plasmaaktivitäten verschiedener Enzyme. Zudem entwickelten die Tiere der Kapselgruppen eine moderate Azidose. Darüberhinaus kam es während der Infusion von PFD-gefüllten Mikrokapseln zu einem transienten systemischen Blutdruckabfall. Dieser wurde vermutlich zum Einen durch die Aktivierung des Komplementsystems, zum Anderen durch mechanische Scherkräfte, die aufgrund des höheren Kapselgewichts der PEG-PLGA+PFD-Mikrokapseln stärker auf das Endothel wirken, ausgelöst. Der für die Herstellung der Mikrokapseln verwendete Emulgator PVA hat weder negative Auswirkungen auf systemische, Blut- und Plasmaparameter, noch konnten bei der histologischen Untersuchung Gewebeschädigungen festgestellt werden.

### 4.1 Das Tiermodell

Für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten tierexperimentellen Studien wurde ein Rattenmodell ausgewählt, indem keine zusätzlichen körperlichen Beeinträchtigungen vorlagen oder hinzugefügt wurden. So konnte gewährleistet werden, dass die Bioverträglichkeit der infundierten Mikrokapseln (PEG-PLGA bzw. PEG-PLGA+PFD) sowie des Emulgators PVA unbeeinflusst von zusätzlichen pathologischen Zuständen untersucht werden konnte. Es wurden nur der zur Überwachung des Tieres notwendige arterielle Femoralkatheter sowie der zur Applikation der versuchsgruppenabhängigen Lösungen erforderliche venöse Femoralkatheter gelegt.

Aufgrund des operativen Eingriffs zur Platzierung der Katheter und der unklaren Prognose bezüglich der physiologischen Reaktion der Tiere auf eine Infusion der verwendeten PEG-PLGA- bzw. PEG-PLGA+PFD-Mikrokapseln und des PVA wurden alle Versuche unter dauerhafter Narkotisierung durchgeführt.

Das im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte Isofluran gilt als das am häufigsten verwendete volatile Inhalationsanästhetikum für Ratten (Vogler 2006). Der Vorteil dieses

Anästhetikums liegt in einer raschen Narkoseeinleitung und einer sensiblen Kontrolle der Narkosetiefe. Allerdings führt Isofluran abhängig von der eingesetzten Dosis zu einer Reduktion der Atemfrequenz, des mittleren arteriellen Blutdrucks (Imai *et al.*, 1999) und der Herzfrequenz (Vogler 2006). Vor allem spontan atmende narkotisierte Tiere können bei einer übermäßigen Isofluranexposition schnell eine Hyperkapnie und/oder Hypoxie entwickeln. Letzteres tritt bei einem verantwortungsvollen mit dem genannten Inhalationsanästhetikums selten auf, da das Trägergas 100 %iger Sauerstoff ist. Alle Inhalationsnarkotika induzieren eine geringe bzw. keine befriedigende Analgesie, so dass zusätzliche Analgetika für eine balancierte Anästhesie notwendig sind (Vogler 2006). Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte Medikamentenkombination bestand aus Ketamin und Lidocain. Ketamin bewirkt eine starke Analgesie mit minimalen Effekten auf Atmung, Blutdruck, Herzfrequenz und Herzleistung (Vogler 2006). Allerdings reicht die subkutane Applikation von Ketamin allein nicht für eine ausreichende Analgesie oder Muskelrelaxation bei einem operativen Eingriff aus, so dass im Rahmen der vorliegenden Arbeit ergänzend das Lokalanästhetikum Lidocain eingesetzt wurde. Darüberhinaus verhindert Lidocain einen Vasospasmus während der Gefäßkanülierung (Vogler 2006).

Aufgrund der balancierten Anästhesie (2.6) konnte die Inhalationsnarkose während der Operation, Infusions- und Beobachtungsphase stabil und so niedrig wie nötig gehalten werden. So konnte die hypotensive Wirkung der erforderlichen Isoflurandosis minimiert und der Einfluss der versuchsgruppenabhängigen Infusionslösung weitestgehend unbeeinflusst von der Narkose evaluiert werden.

#### **4.2 Intravasale Halbwertszeit der soliden (PEG-PLGA) bzw. mit Perfluordekalin-gefüllten (PEG-PLGA+PFD) Mikrokapseln**

Neben der Verwendung von PLGA als Kapselwandmaterial spielen bezüglich Abbau, Bioverträglichkeit und intravasaler Halbwertszeit auch der zur Synthese eingesetzte Emulgator (PVA), die Beschichtung der Mikrokapseln (PEG), der Kapselkern sowie der Mikrokapseldurchmesser eine entscheidende Rolle.

Die Synthese der in der vorliegenden Arbeit verwendeten soliden und PFD-gefüllten Mikrokapseln erfolgte unter Verwendung des Tensids PVA als Emulsionsstabilisator. Bisher wurde zur Herstellung von Nano- und Mikrosystemen hauptsächlich ein längererkettiger PVA als Stabilisator verwendet (Pisani *et al.*, 2006; Mundargi *et al.*, 2008), wenngleich bereits bekannt ist, dass dieser nach intravenöser Injektion unerwünschte Nebenwirkungen hervorruft (Verrecchia *et al.*, 1995; Youan *et al.*, 2003; Dalwadi und

Sunderland 2007) und nur schwer nach der Synthese aus dem Produkt entfernt werden kann (Sahoo *et al.*, 2002; Mundargi *et al.*, 2008). Im Gegensatz dazu kann der hier eingesetzte kurzkettige PVA ohne Probleme über die Nieren ausgeschieden werden (Tabata *et al.*, 1998; Kaneo *et al.*, 2005) und wird so zum Mittel der Wahl für intravenöse Applikationsformen. Des Weiteren zeigen *in vitro* Versuche unserer Arbeitsgruppe (Daten hier nicht gezeigt), dass eine Agglomeration der Mikrokapseln durch den verwendeten PVA verhindert werden konnte (Ferez *et al.*, 2013).

Da die positiven Eigenschaften von PEG für die Entwicklung langzirkulierender Partikel bereits ausführlich in der Literatur beschrieben sind, wurden die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Mikrokapseln mit diesem Polymer beschichtet. PEG ist nicht toxisch und, wie PLGA, bereits durch die FDA zugelassen (Gref *et al.*, 1995). Aufgrund seines hydrophilen nicht-ionischen Charakters (Dinarvand *et al.*, 2011) erweist sich PEG als kompetenter Schutz gegen die Adsorption von Proteinen und verzögert dadurch die Opsonisierung von Nanopartikeln (Owens und Peppas 2006). Für die Synthese der im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Mikrokapseln, wurde ein niedermolekularer PEG (MW=5000 Da) eingesetzt. Die Verwendung dieses PEGs führt zu einer optimalen Reduzierung der Proteinadsorption auf der Oberfläche von PEG-PLA-Nanokapseln (Gref *et al.*, 2000). Der bevorzugte Ausscheidungsweg dieses PEG-Typs verläuft aufgrund der geringen Größe renal (Webster *et al.*, 2007).

Neben den Vorzügen von PEG wird in der Literatur überwiegend postuliert, dass lange zirkulatorische Halbwertszeiten innerhalb der Vaskulatur ausschließlich durch Nanopartikel mit einer Größe von 70-200 nm zu erreichen sind. So wird eine Filtration der Nanopartikel durch die Milz unter einem Durchmesser von 200 nm verhindert (Gref *et al.*, 1995; Shan *et al.*, 2009) und mit einem Durchmesser >70 nm gewährleistet, dass die Partikel nicht in die fenestrierten Leberkapillaren einwandern können (Zhao *et al.*, 2007; Shan *et al.*, 2009). Kritisch wird indes diskutiert, dass Nanopartikel aufgrund ihrer geringen Größe physiologische Barrieren leichter überwinden können und einer deutlich höheren intrazellulären Aufnahme ausgesetzt sind (Song *et al.*, 2010). Die vermehrte zelluläre Absorption von Nanopartikeln (Harush-Frenkel *et al.*, 2008) erweist sich allerdings als kontraindiziert, wenn eine lange zirkulatorische Halbwertszeit zielgebend ist. Im Gegensatz zu Nanopartikeln werden Mikropartikel besonders effektiv vom Endothel am Verlassen des Gefäßsystems gehindert (Nguyen *et al.*, 2009). Daher wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit PEG-PLGA- und PEG-PLGA+PFD-Mikrokapseln mit einem Durchmesser von 1,5 µm synthetisiert, die diese physiologische Barriere nicht überwinden können und so eine verlängerte Halbwertszeit im vaskulären System aufweisen. Zudem wurden die verwendeten Mikrokapseln über eine chemische Bindung

mit PEG beschichtet, das eine deutliche Verlängerung der Partikel-Halbwertszeit bewirkt (Gref *et al.*, 1995; Dinarvand *et al.*, 2011). So verbleiben PEG-lierte Nanosphären nach intravenöser Applikation in Ratten und Mäusen für Stunden in deren Blutkreislauf, wohingegen unbeschichtete Nanosphären innerhalb weniger Minuten aus der Vaskulatur eliminiert werden (Gref *et al.*, 1994; Panagi *et al.*, 2001). *In vitro* durchgeführte Untersuchungen zeigten, dass auch die Wahl des zur Synthese verwendeten Emulgators eine wichtige Rolle spielt. So verringert der Emulgator PVA sowohl eine Agglomeration der Mikrokapseln als auch eine Proteinadsorption. Eine geringe Anlagerung von Immunglobulin G (IgG) auf der Mikrokapseloberfläche geht mit einer niedrigen Aufnahmerate der Mikrokapseln durch das RES einher, so dass sich aufgrund dessen eine erstrebenswerte dosisunabhängige Kinetik erster Ordnung ergibt (Panagi *et al.*, 2001; Ferenz *et al.*, 2013). Die beschriebene Kinetik wurde ebenfalls in den im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten *in vivo* Studien beobachtet. So zeigte sich im Blutkreislauf eine mit den Daten von Li *et al.* (Li *et al.*, 2001) und Panagi *et al.* (Panagi *et al.*, 2001) vergleichbare exponentielle Abnahme sowohl der soliden als auch PFD-gefüllten PEG-PLGA-Mikrokapseln, die offenbar einer dosisunabhängigen Kinetik erster Ordnung unterlag (Abb.15). Die mit PFD-gefüllten Mikrokapseln zeigen mit rund einer Stunde (Abb.15) eine beachtliche Halbwertszeit und liegen damit deutlich über der von Poly( $\epsilon$ -Caprolacton) Partikeln mit einem Durchmesser von 1-10  $\mu\text{m}$ , die bereits nach 15 min aus dem Blutkreislauf eliminiert sind (Zhao *et al.*, 2007). Dahingegen zeigten die Studien von Mosquera *et al.* mit den in dieser Arbeit evaluierten Daten vergleichbare Ergebnisse bezüglich der zirkulatorischen Halbwertszeit. So verlängerte die PEG-lierung der Nanopartikel zwar deren Verweildauer im Blutkreislauf; diese blieb aber dennoch unter einer Stunde (Mosqueira *et al.*, 2001).

Dass die PFD-gefüllten PEG-PLGA-Mikrokapseln eine längere Halbwertszeit aufweisen als die soliden Mikrokapseln (Abb.15), hängt vermutlich mit einem zusätzlichen Schutzeffekt durch die PFD-Moleküle zusammen. So ist bereits beschrieben, dass Typ und Menge des an die Oberfläche von PEG-PLGA-Nanopartikeln adsorbierten Proteins von der Art des Kapselkerns abhängen (Gref *et al.*, 2000). Hinzu kommt, dass das PFD der im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten PEG-PLGA+PFD-Mikrokapseln sich nicht ausschließlich im Kern der Kapseln befindet. Vielmehr ist ein Teil des PFD auch in der Kapselwand eingelagert und steht damit in direkten Kontakt mit Serumproteinen. Diesbezüglich ist die chemische Inertheit des PFD von Bedeutung. Es ist unfähig Wasserstoffbrückenbindungen einzugehen und ist damit unvermischbar mit wässrigen Lösungen wie Blut und anderen Körperflüssigkeiten (Lowe 2001). *In vitro* Versuche (Daten hier nicht gezeigt), die zeigen, dass PFD die Adsorption von IgG an die



Kapseloberfläche in einem zu PVA vergleichbaren Maß reduziert (Ferenz *et al.*, 2013), machen einen Schutzeffekt von PFD wahrscheinlich.

Bei der Durchführung tierexperimenteller Studien an Ratten ist generell bei der Diskussion von Halbwertszeiten intravenös applizierter Mikro- und Nanopartikel darauf zu achten, dass das RES dieser Tiere deutlich aktiver in der Absorption von Partikeln reagiert als das humane System (Chang *et al.*, 2003). Aufgrund dessen ist davon auszugehen, dass die Halbwertszeit der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten PEG-PLGA-Mikrokapseln in einem menschlichen Organismus die mit etwa einer Stunde ermittelte Halbwertszeit deutlich übersteigt.

#### **4.3 Bedeutung des Kapselkerns sowie des Emulgators von PEG-PLGA-Mikrokapseln für den mittleren arteriellen Blutdruck**

Die Infusion der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten PFD-gefüllten PEG-PLGA-Mikrokapseln führte unabhängig von der Infusionsgeschwindigkeit zu einem vorübergehenden systemischen Blutdruckabfall kurz nach Infusionsbeginn (Abb.10A, Abb.16A). Diese, vermutlich durch eine Vasodilatation ausgelöste, Hypotension wurde bereits in der Literatur im Zusammenhang mit artifiziellen Sauerstofftransportlösungen bzw. Arzneimitteltransportsystemen diskutiert (Tremper *et al.*, 1982; Waxman *et al.*, 1984; Faithfull *et al.*, 1987; Moghimi *et al.*, 2011). Basis dieser Studien war u.a. Fluosol<sup>®</sup>, ein synthetischer, perfluorcarbonbasierter Sauerstoffträger der ersten Generation, mit Pluronic F68 und Lecithin als Emulgatoren (Verhältnis 7:1) (Mattrey *et al.*, 1989; Flaim 1994; Lowe 2003). Sowohl Vercelotti *et al.* als auch Mattrey *et al.* konnten in ihren Studien den Emulgator Pluronic F68 mit der auftretenden Hypotension korrelieren (Vercelotti *et al.*, 1982; Mattrey *et al.*, 1989), indes konnten Ingram *et al.* keine hämodynamische Reaktion auf die isolierte Infusion der Pluronic F68 Komponente beobachten. Jedoch resultierte die Kombination von Pluronic F68 mit den beiden Perfluorcarbonkomponenten von Fluosol<sup>®</sup> (Perfluordekalin: 14%; Perfluortripropylamin: 6%) in einer ausgeprägten Anaphylaxie die mit einem vorübergehenden Blutdruckabfall belegt wurde (Ingram *et al.*, 1993). Die Konzentration des in der vorliegenden Arbeit zur Synthese der soliden bzw. PFD-gefüllten PEG-PLGA-Mikrokapseln verwendeten Emulgators liegt mit maximal 0,25 % (w/v) Rückstand in der Kapselsuspension deutlich unter derjenigen von Pluronic F68 in Fluosol<sup>®</sup> (2,7 % w/v) (Vercelotti *et al.*, 1982). Zudem wird der kurzkettige PVA in der Literatur als biologisch unbedenklich beschrieben, da er unkompliziert über die Nieren eliminiert werden kann (Tabata *et al.*, 1998; Kaneo *et al.*, 2005). Die gute Verträglichkeit belegen auch die evaluierten Daten der vorliegenden Arbeit. Tiere, die eine Infusion von

kapselfreier 0,25 %iger PVA-Lösung erhielten, zeigten zu keinem Zeitpunkt pathologische Veränderungen des MAP (Abb.16A). Sowohl während als auch nach der Infusionsphase unterlag der MAP marginalen Schwankungen, die sich im physiologischen Bereich (Systole: 88-184 mmHg; Diastole: 58-145 mmHg; (Suckow *et al.*, 2006) bewegten. Eine Infusion der soliden PEG-PLGA-Mikrokapseln ergab vergleichbare Resultate, so dass bei den Versuchen der vorliegenden Arbeit nur die Kombination eines zur Kapselsynthese verwendeten Materials mit Perfluorodekalin zu der vorübergehenden Hypotension führten; vergleichbar mit den Ergebnissen von Ingram *et al.* (Ingram *et al.*, 1993).

In der Literatur wird überwiegend von einer Aktivierung des Komplementsystems und einer damit verbundenen Freisetzung vasoaktiver Substanzen ausgegangen (Vercellotti *et al.*, 1982; Mattrey *et al.*, 1989; Ingram *et al.*, 1993; Vonarbourg *et al.*, 2006; Moghimi *et al.*, 2011). Aufgrund dessen wurden im Rahmen der zweiten Versuchsserie der Komplementfaktor 3 (C3) sowie das Komplementfragment 4a (C4a) zu drei definierten Zeitpunkten bestimmt (2.15.2). Das Komplementsystem ist als Teil der humoralen unspezifischen (angeborenen) Immunantwort ständig aktiv, um eingedrungene körperfremde Substanzen sofort zu erkennen und Maßnahmen zu deren Eliminierung einleiten zu können (Deetjen *et al.*, 2005). Das Komplementsystem ist eine sehr komplex aufgebaute enzymatische Kaskade an der mehr als 30 Plasmaproteine beteiligt sind (Gauvreau *et al.*, 2012). Die Aktivierung dieser Kaskade kann über den klassischen, den alternativen oder den Lektin Weg erfolgen (Deetjen *et al.*, 2005). Aktuelle Studien gehen davon aus, dass durch Infusion von Nanopartikeln in die Vaskulatur eine Aktivierung der Komplementkaskade sowohl durch den klassischen als auch den alternativen Weg ausgelöst wird (Vonarbourg *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2010). Der klassische Aktivierungsweg wird vor allem durch die Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen eingeleitet. Dabei treten in erster Linie die im Serum dominanten Antikörper (Zhu *et al.*, 2011) des Typs IgG und IgM auf. Durch die Bindung an ein Antigen verändern IgG und IgM ihre sterische Konfiguration, so dass sich die erste Aktivierungskomponente der klassischen Komplementkaskade C1 an die C2-Domäne der Fc-Region dieser Antikörper anlagern kann. Dadurch wird eine weitere Konformationsänderung ausgelöst. Der entstehende C1r2s2-Komplex bewirkt eine proteolytische Spaltung des Komplementfaktors C4 in die Fragmente C4a und C4b. Während C4b kovalent an C2b bindet und so die C3-Konvertase des klassischen Aktivierungswegs (spaltet C3 in die Fragmente C3a und C3b) bildet, wirkt das sich in Lösung befindliche C4a-Fragment als Anaphylatoxin (Deetjen *et al.*, 2005; Egger 2005). Eine Aktivierung der klassischen Komplementkaskade durch die im Rahmen der vorliegenden Arbeit infundierten PEG-PLGA+PFD-Mikrokapseln liegt aufgrund der, unabhängig von der Versuchsdauer,

signifikant erhöhten C4a Plasmawerte (Abb.21B) nahe. In der Literatur wird bereits postuliert, dass in die Zirkulation eingebrachte (z.B. durch Infusion, Transplantation) künstliche, solide Oberflächen (z.B. Polymeroberflächen) die im Blut vorhandenen Proteine adsorbieren, so dass innerhalb von Millisekunden ein Proteinmonolayer entsteht (Ekdahl *et al.*, 2011). Für die Plasmaproteine IgG und C3 ist bereits bekannt, dass sie durch die Adsorption an eine artifizielle Oberfläche eine Konformationsänderung erfahren und so den klassischen bzw. alternativen Komplementweg aktivieren (Nilsson *et al.*, 2010). *In vitro* Versuche haben gezeigt (Daten hier nicht gezeigt), dass IgG nicht vermehrt an die in dieser Arbeit eingesetzten PFD-gefüllten PEG-PLGA-Mikrokapseln adsorbiert (Ferez *et al.*, 2013). Dieses Resultat legt nahe, dass die Aktivierung der klassischen Komplementkaskade nach einer Infusion von PEG-PLGA+PFD-Mikrokapseln vermutlich nicht ausschließlich durch IgG, sondern auch durch IgM ausgelöst wird. Im Gegensatz zu IgG, das eine gewisse Mindestdichte auf der pathogenen Oberfläche aufweisen muss, reicht bereits ein einzelnes gebundenes IgM Molekül aus, um C1 zu aktivieren (Egger 2005).

Die Komplementaktivierung über den alternativen Weg verläuft dagegen antikörperunabhängig. Der basale Komplementfaktor C3 kann nicht nur durch die klassische C3-Konvertase aktiviert werden, sondern auch durch spontane Hydrolyse (Gauvreau *et al.*, 2012). Findet das dabei entstehende C3b Fragment keinen Bindungspartner (in diesem Falle eine pathogene Oberfläche), wird es durch die Faktoren I und H inaktiviert. Kommt es allerdings zu einer Bindung, wird die alternative Kaskade der Komplementaktivierung sofort verstärkt (Deetjen *et al.*, 2005). Es entsteht die alternative C3-Konvertase, die C3 in dessen Fragmente a und b spaltet, so dass ein positives Feedback entsteht und die Aktivierung des alternativen Weges zusätzlich verstärkt wird (Andersson *et al.*, 2002; Ekdahl *et al.*, 2011). Nilsson *et al.* konnten in ihren Studien zeigen, dass die Konformationsänderung adsorbierter C3 Moleküle an Biomaterialien die gebundene Konfiguration von C3b imitiert (Nilsson *et al.*, 2007). Infolgedessen kann eine initiale C3-Konvertase generiert werden, die die Aktivierung und Verstärkung über den alternativen Aktivierungsweg triggert (Nilsson *et al.*, 2007). Vermutlich dadurch, dass C3 in seine Fragmente a und b gespalten wird, konnten im Plasma der mit PEG-PLGA+PFD-Mikrokapseln infundierten Tiere nach einer Versuchsdauer von 90 und 150 min keine Unterschiede in der C3-Konzentration im Vergleich zur NaCl-Kontrollgruppe detektiert werden (Abb.21A). Vielmehr spricht die gegenüber der NaCl-Kontrolle signifikant erniedrigte C3-Plasmakonzentration nach 270 min für einen vermehrten Verbrauch des Faktors C3. Warum die Konzentration in dem Plasma der mit PVA infundierten Tiere nach 270 min ebenfalls gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erniedrigt ist, konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden.

Durch die Opsonisierung mit C3b werden die körperfremden Partikel durch aktivierte Leukozyten, vor allem durch an der Innenwand der Lebersinusoiden sitzende Kupfferzellen und Milzmakrophagen der Marginalzone und roten Pulpa (Moghimi *et al.*, 2011), rezeptorvermittelt phagozytiert (Ekdahl *et al.*, 2011). Zudem entsteht, unabhängig vom aktivierenden Weg, bei der Komplementaktivierung das sehr potente Anaphylatoxin C5a, das zusammen mit C3a und C4a pro-inflammatorisch wirkt (Vonarbourg *et al.*, 2006; Ekdahl *et al.*, 2011; Moghimi *et al.*, 2011). Anaphylatoxine bewirken als Entzündungsmediatoren die Degranulation von Mastzellen und basophilen Granulozyten und damit die Freisetzung vasoaktiver Substanzen (Greer 1986; Davies 2001). Außerdem nehmen die Anaphylatoxine C3a und C5a Einfluss auf die Vasodilatation der Blutgefäße (Klos *et al.*, 2009), so dass die auftretende Hypotension während der Infusionsphase vermutlich u.a. auf die Erhöhung dieser beiden Komplementfragmente zurückzuführen ist.

Zusätzlich zur Komplementsystem-induzierten Hypotension besitzt der Organismus weitere Kontrollmechanismen der Durchblutungsregulation. Neben der neural-humoralen Regulation beeinflussen auch lokale Kontrollmechanismen der Peripherie den Gefäßtonus. Dabei spielt unter anderem das Endothel der Blutgefäße eine bedeutsame Rolle, das durch den Einfluss vasoaktiver Substanzen oder einer erhöhten Schubspannung Faktoren entlässt, die über die glatte Gefäßmuskulatur den Gefäßtonus beeinflussen. Ein solcher Faktor ist das Radikal Stickstoffmonoxid (NO) (Deetjen *et al.*, 2005; Schmidt *et al.*, 2010). In den Endothelzellen wird durch die konstitutiv exprimierte endotheliale NO-Synthase (eNOS) ein Molekül L-Arginin sukzessiv durch zwei Monooxygenase-Reaktionen zu NO und L-Citrullin abgebaut (MacMicking *et al.*, 1997). Zum Einen wird die NO-Synthese, z.B. durch Gewebshormone oder Transmitter, rezeptorvermittelt stimuliert. Zum Anderen wird durch den steten Blutfluss eine Schubspannung erzeugt, die eine Abscherung des Endothels mit der Strömungsrichtung verursacht und dadurch ebenfalls die NO-Bildung anregt (Kerwin und Heller 1994). Das NO-Radikal kann aufgrund seiner geringen Größe und hydrophoben Eigenschaften durch simple Diffusion und ebenso einfach wie Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid biologische Membranen passieren (Kerwin und Heller 1994; Pacher *et al.*, 2007). In den Zellen der glatten Gefäßmuskulatur bindet NO an die lösliche Guanylatcyclase die die Umwandlung von Guanosintriphosphat in zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) katalysiert (Schmidt *et al.*, 2010). Der *Second Messenger* cGMP aktiviert cGMP-abhängige Kinasen die die intrazelluläre Calciumkonzentration beeinflussen können (Pacher *et al.*, 2007). Durch das Absenken der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration erschlafft die glatte Muskulatur der Blutgefäße (Vasodilatation) (Schmidt *et al.*, 2010). Die Infusion der versuchsgruppenabhängigen Lösungen führt aufgrund des gewählten Tierrmodells (4.1)

zu einem kurzzeitig erhöhten Intravasalvolumen. Zusätzlich zu diesem Volumeneffekt aller Lösungen besitzen die PFD-gefüllten Mikrokapseln aufgrund der hohen Dichte des PFD, im Vergleich zu den soliden Mikrokapseln ein höheres Kapselgewicht. Vor allem der letzte Aspekt führt vermutlich, bei einer Infusion von PEG-PLGA+PFD-Mikrokapseln, zu einer deutlich erhöhten Schubspannung in den Blutgefäßen. Diese wiederum hat eine verstärkte Abscherung des Endothels zur Folge, wodurch es zu einer gesteigerten Aktivierung der eNOS und damit zu einer vermehrten NO-Bildung kommen kann (Harrison *et al.*, 2006). Das freigesetzte NO könnte so die initiale Hypotension direkt nach Infusionsbeginn einer PEG-PLGA+PFD-Mikrokapselinfusion auslösen. Aufgrund der Kapselgröße beginnt die Filtration der infundierten Mikrokapseln unmittelbar nach Beginn. Zusätzlich diffundiert die NaCl-Lösung in das Interstitium, so dass mit fortschreitender Versuchsdauer die Schubspannung in den Blutgefäßen wieder reduziert wird. Damit nehmen auch die mechanischen Scherkräfte ab; der MAP erholt sich wieder. Aufgrund dessen besteht die Möglichkeit, dass es sich bei der initialen Hypotension um einen volumenbedingten bzw. gewichtbedingten Effekt handelt. Eine rezeptorvermittelte NO-Stimulation, etwa durch Gewebshormone oder Transmitter, ist mit den bisher durchgeführten Untersuchungen nicht vollkommen auszuschließen, aber aufgrund des zeitlichen Verlaufs des Blutdruckabfalls unwahrscheinlicher. Dies wird auch durch die Auswertung der kumulativen Nitritkonzentration unterstützt. Dadurch, dass sich der MAP aufgrund der nachlassenden Schubspannung wieder erholt, d.h. wieder im physiologisch tolerierbaren Bereich liegt, werden in den Plasmaproben nach 90 und 150 min keine signifikant erhöhten Nitritkonzentrationen detektiert (Abb.20).

Neben der eNOS kann auch die induzierbare NOS (iNOS) in den Makrophagen vermehrt NO freisetzen. Die iNOS ist im Gegensatz zur eNOS kein konstitutiv exprimiertes Enzym. Die Expression der iNOS in den Makrophagen wird erst nach Stimulation durch die Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1 initiiert (Szabó *et al.*, 1993) und daher benötigt dieser Vorgang deutlich mehr Zeit, als die kurzfristige NO-Freisetzung durch die eNOS. Nach Infusion der PEG-PLGA+PFD-Mikrokapseln kommt es mit fortschreitender Versuchsdauer zu einer signifikant erhöhten Konzentration der Zytokine IL-1 ( $\alpha$ - und  $\beta$ -Typ), IL-6 und TNF- $\alpha$  (Abb.22A/B/E; Tab.9). Hauptquelle für die Produktion und Freisetzung dieser drei inflammatorischen Parameter sind aktivierte Monozyten/Makrophagen. Die Aktivierung erfolgt u.a. durch den Kontakt mit opsonisierten Partikeln, mit den Komplementfragmenten C3a und C5a, mit TNF- $\alpha$  sowie durch Phagozytose körperfremden Materials (Egger 2005). Auch das Gefäßendothel kann, nach Stimulation durch C3a und C5a IL-1 freisetzen. Durch die Initiierung der iNOS wird der inflammatorische Prozess verstärkt, wodurch es zu einem signifikanten Anstieg der Nitritkonzentration nach 270 min kommt. Da der MAP zu diesem Zeitpunkt allerdings stabil im physiologischen Bereich liegt,

scheint die detektierte Nitritkonzentration nicht auszureichen, um eine erneute Hypotension auszulösen. Insgesamt decken sich die Ergebnisse mit den Darstellungen von Thasneem *et al.* und Castro und Briceno, die eine vermehrte Zytokinsekretion im Zusammenhang mit der Applikation von PLGA-Nanopartikeln bzw. perfluorcarbonbasierten Sauerstoffträgern beschrieben haben (Castro und Briceno 2010; Thasneem *et al.*, 2011).

Das Sympathomimetikum Phenylephrin ist ein selektiver Agonist des  $\alpha_1$ -Adrenozeptors und bewirkt eine Erhöhung des arteriellen Blutdrucks durch eine periphere Vasokonstriktion (Ishikawa *et al.*, 2009; Morimatsu *et al.*, 2012). Ausgehend von diesem Sachverhalt wurde in der Evaluierungsreihe untersucht, welche Auswirkung Phenylephrin als zusätzlicher Bestandteil einer PEG-PLGA+PFD-Mikrokapselinfusion (2.15.3) auf den initialen systemischen Blutdruckabfall hat. Wie die Auswertung der Ergebnisse zeigt (Abb.24), steigt der MAP kurz nach Infusionsbeginn an, fällt jedoch nach 15 min deutlich ab. Diese Abnahme verläuft im Vergleich mit einer reinen PEG-PLGA+PFD-Mikrokapselinfusion ohne weitere Zusätze ähnlich ausgeprägt.

Bei einer Entzündungsreaktion entstehen innerhalb weniger Sekunden über den Cyclooxygenaseweg u.a. die Eikosanoide Prostaglandin  $E_2$  und Prostaglandin  $I_2$  (Prostacyclin). Beide Gewebemediatoren können eine durch Katecholamine und Angiotensin II bedingte Vasokonstriktion antagonisieren (Egger 2005) und wirken zudem (v.a. Prostacyclin) NO-unabhängig direkt über spezifische Rezeptoren am Gefäßmuskel (stark) dilatierend. Eine durch PEG-PLGA+PFD-Mikrokapseln induzierte akute Entzündungsreaktion und dadurch bedingt ein vermehrtes Aufkommen der oben genannten Gewebemediatoren wäre ebenfalls eine mögliche Erklärung für die vorübergehende Hypotension. Zudem üben die Mikrokapseln aufgrund ihres hohen Gewichts erhebliche Scherkräfte auf die Gefäßwand aus. Daraus resultiert, durch Erhöhung der Aktivität der Cyclooxygenase und Prostacyclinsynthese, eine gesteigerte Produktion von Prostacyclin (Ivy 2010).

Das Nitroderivat der Aminosäure Arginin, L-NAME, ist ein reversibler und nicht-selektiver Inhibitor, der bei der Untersuchung von NO-Effekten weit verbreitet ist (Kopincová *et al.*, 2012). L-NAME inhibiert die NOS, so dass NO als Antagonist für diverse vasokonstriktorische Faktoren als Teil des sympathischen Nervensystems (Kopincová *et al.*, 2012) nicht mehr zur Verfügung steht. Ausgehend von diesem Sachverhalt wurde in der Evaluierungsreihe untersucht, ob eine der PEG-PLGA+PFD-Mikrokapselinfusion vorangehende Applikation von L-NAME (2.15.3) die infusionsbedingte Hypotension beeinflusst. Die kontinuierliche NO-Produktion im Endothel, die stets die Balance

zwischen Vasokonstriktion und Vasodilatation reguliert (Kopincová *et al.*, 2012), wird durch einen intravenösen L-NAME Bolus inhibiert, so dass sich der MAP unmittelbar nach Applikation deutlich erhöht (Abb.24). Während der MAP nach Infusionsstart der Mikro kapseln zunächst ansteigt, fällt er danach trotz der NOS-Blockade rapide ab. Im Vergleich mit einer PEG-PLGA+PFD-Mikro kapselinfusion ohne einen vorherigen L-NAME Bolus bedeutet dies einen ebenso drastischen, wenn auch zeitverzögerten (ca. 25 min), systemischen Blutdruckabfall. Dieser Effekt ist aufgrund der Halbwertszeit von L-NAME von ca. 250 min (Mitsube *et al.*, 2002) nicht auf eine nachlassende Wirkung des Inhibitors zurückzuführen. Korrespondierend mit den anderen Ergebnissen dieser Arbeit ist die durch NOS katalysierte Bildung von NO vermutlich nicht allein ursächlich für die auftretende Hypotension.

Zusammenfassend scheint die Ursache für die transiente Hypotension ein Zusammenspiel mehrerer Effekte zu sein. Zum Einen die Komplementaktivierung vermutlich ausgelöst durch die Kombination von PFD und dem zur Kapselsynthese verwendeten Material. Zum Anderen die mechanischen Scherkräfte, die aufgrund des höheren Gewichts der PEG-PLGA+PFD-Mikro kapseln stärker auf das Endothel wirken, als in den anderen Versuchsgruppen und so vermehrt vasoaktive Substanzen freisetzen. Aufgrund der Datenlage scheinen der Volumeneffekt, denn dieser trat in allen Versuchsgruppen gleichermaßen auf, sowie NO-abhängige Mechanismen nicht die Hauptursachen für den initialen systemischen Blutdruckabfall zu sein.

#### **4.4 Bedeutung des Kapselkerns sowie des Emulgators von PEG-PLGA-Mikro kapseln für Blut- und Plasmaparameter**

Die Auswertung der Blutgasanalysen zeigt für die Tiere, die eine Infusion der PEG-PLGA+PFD- oder PEG-PLGA-Mikro kapseln erhielten signifikant erniedrigte Werte des *Base Excess* und der Standardbicarbonatkonzentration gegenüber der NaCl-Kontrollgruppe (Abb.11C/D und Abb.17C/D). Zusammen mit der leichten Abnahme des pH-Wertes (Abb.11A und Abb.17A) deuten beide Parameter darauf hin, dass die kapselinfundierten Tiere eine moderate Azidose entwickeln. Dass es sich um eine metabolische und keine respiratorische Störung handelt, belegen auch der nahezu konstante  $p\text{CO}_2$  (Abb.11B und Abb. 17B) und ein Anstieg des Laktatspiegels. Da es in der Versuchsgruppe der mit PFD-gefüllten Mikro kapseln infundierten Tiere zu einer hypotensiven Phase kurz nach Infusionsbeginn kommt, ist davon auszugehen, dass es zu einer transienten Entwicklung hypoxischer Areale kommt. Die Leber ist unter

physiologischen Bedingungen das Hauptorgan des Laktatmetabolismus. Rund 60 % der täglich produzierten Laktatkonzentration werden von ihr entweder zu Glukose umgewandelt oder zu  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}$  abgebaut (Park 1980). Bei einer, mit einer Hypotension einhergehenden, Minderperfusion kommt es in den betroffenen Arealen zu einer Unterversorgung mit Sauerstoff. Folge dieser partiellen Hypoxie ist eine vermehrt ablaufende anaerobe Glykolyse (Robergs *et al.*, 2004), so dass es unmittelbar (Abb.12B) bzw. 120 min (Abb.18B) nach der Infusionsphase zu einer Akkumulation von Laktat im Blut kommt. Als Folge des anaeroben Stoffwechsels und des Glukosemehrabbedarfs in den hypoxischen Arealen der Leber wird Glukose vermehrt aus Glykogen bereitgestellt. Konsequenz aus dem nicht ausreichenden Abbau der Glukose ist eine transiente Hyperglykämie (Abb.12A; Abb.18A). Dass eine Infusion solider PEG-PLGA-Mikrokapseln ebenfalls zu einem leichten Anstieg der arteriellen Laktatkonzentration führt (60 min nach der Infusionsphase; Abb.12B), liegt vermutlich daran, dass es zu einer kurzfristigen Obstruktion kleiner Kapillaren kommt. So entstehen ebenfalls temporär hypoxische Areale, die zu einer zunehmenden Laktatproduktion führen. Dieser Effekt ist allerdings im Vergleich mit den PFD-gefüllten Mikrokapseln weniger stark ausgeprägt, was sich in dem Ausbleiben einer Hyperglykämie manifestiert (Abb.12A). Da es sich bei der auftretenden Hypotension um einen kurzzeitigen Effekt handelt, stabilisieren sich die Laktatkonzentration im weiteren Versuchsverlauf und zunächst auch die Blutglukosekonzentration wieder auf Ausgangsniveau. Eine mögliche Ursache für die anschließende Abnahme der Glukosekonzentration, in den Versuchsgruppen der kapselinfundierten Tiere, kann zum Einen darin begründet liegen, dass die Leber die kurzfristige Bereitstellung der Glukosereserven (Hyperglykämie) über den weiteren Versuchsverlauf nicht mehr kompensieren kann. Zum Anderen können wichtige Substrate des Energiestoffwechsels durch die massive Gewebeschädigung (4.5) der Leber und anderer Organe nicht mehr in ausreichender Menge bereitgestellt werden. Durch die vermehrt ablaufende anaerobe Glykolyse kommt es neben einer Akkumulation von Laktat auch zu einer gesteigerten Bildung von Protonen (Azidose) (Robergs *et al.*, 2004). Die Protonen, die während der Hydrolyse von ATP entstehen, können unter physiologischen Bedingungen auch wieder verarbeitet werden. Sie gelangen durch direkten Transport oder durch verschiedene Shuttle-Systeme ins Mitochondrium, wo sie zur Erhaltung des Protonengradienten zwischen Intracristaeraum und Matrix gebraucht werden (Robergs und Amann 2003). Durch den gesteigerten anaeroben Stoffwechsel übersteigt die Rate der gebildeten Protonen die, der durch die Mitochondrien nutzbare Rate. Folge ist die Entwicklung einer moderaten Azidose.

Korrespondierend zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit beschrieben Sedova *et al.* eine metabolische Azidose. Die Wissenschaftler applizierten Ratten eine



Emulsionsmischung aus Perfluordekalin und Perfluortripropylamin. Bereits zehn Minuten nach der Applikation kam es zu einer Hypotension. Die dadurch entstandene Hypoxie führte schließlich zu der Entwicklung einer metabolischen Azidose (Sedova *et al.*, 1998).

Prinzipiell tritt jedes artifizielle Material, das intravasal verabreicht wird, mit dem Blut und dadurch mit in diesem enthaltenen verschiedenen Erkennungsmolekülen des Gerinnungssystems, wie z.B. Faktor VII und dem Tissue Factor in Berührung. Auf diesem Weg führt der erste Kontakt zur Generierung wirksamer Mediatoren, wie z.B. dem Thrombin des Gerinnungssystems. Thrombin wiederum kann durch Aktivierung der Thrombozyten thrombotische Reaktionen auslösen, die sich nicht nur lokal (in der Nähe des artifiziellen Materials), sondern auch im gesamten Körper auswirken können (Ekdahl *et al.*, 2011). Bei der makroskopischen Begutachtung der inneren Organe in Serie 1 zeigten sich Petechien im Dünndarm der mit PEG-PLGA+PFD infundierten Tiere (3.1.5). Petechiale Blutungen sind u.a. Merkmal einer Thrombozytopenie oder einer Thrombozytopathie. Eine Thrombozytopenie, welche zu Störungen der primären Hämostase bzw. einer Aktivierung des Gerinnungssystems führen kann, wird bereits in der Literatur im Zusammenhang mit artifiziellen Sauerstofftransportlösungen bzw. mit dem grundsätzlichen Einsatz von Biomaterialien diskutiert. Die Infusion von Fluosol®, einer synthetischen, perfluorcarbonbasierten Sauerstofftransportlösung der ersten Generation, führte bei Hunden neben einer Aktivierung des Komplementsystems auch zu einer Thrombozytopenie (Ingram *et al.*, 1993).

Aufgrund dieser Faktenlage wurde im Rahmen der zweiten Versuchsserie eine Analyse der viskoelastischen Eigenschaften des Blutes, nach Infusion von PEG-PLGA+PFD-Mikrokapseln, mit Hilfe eines ROTEM® Vollblut-Hämostase-Systems durchgeführt (2.13). Bei der Evaluierung dieser Daten zeigte sich zwar eine signifikant erniedrigte *clot formation time* (CFT) nach 150 und 270 min bei den mit PEG-PLGA+PFD-Mikrokapseln behandelten Tieren im Vergleich mit der NaCl-Kontrollgruppe (Tab.8). Jedoch muss dies nicht zwingend einen Effekt der infundierten Mikrokapseln auf die Gerinnung *in vivo* bedeuten. Vielmehr ist es denkbar, dass die Anwesenheit der Kapseln *per se* als unnatürlicher Bestandteil in den Blutproben der *in vitro* Messungen, Einfluss auf das Erreichen einer Gerinnselfestigkeit von 20 mm nehmen kann. Bei der Interpretation der durch das ROTEM® ermittelten Daten ist stets zu berücksichtigen, dass es sich hier um ein artifizielles System handelt, das nicht den gesamten Gerinnungsprozess darstellt. So wird weder die intravasale Strömungsdynamik berücksichtigt (Lang und Depka 2006) noch können mit der Thrombelastometrie Störungen der primären Hämostase festgestellt werden (Kehrel 2011). Des Weiteren zeigt die Auswertung der *clotting time* (CT), der *maximum clot firmness* (MCF), dem  $\alpha$ -Winkel und Lyse-Index nach 60 min (LI60) keine

signifikanten Effekte im Blut der mit PEG-PLGA+PFD-Mikrokapseln infundierten Tiere im Vergleich mit der NaCl-Kontrollgruppe. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zu einem möglichen Einfluss der Mikrokapseln auf die Gerinnung, speziell der Entwicklung einer Thrombozytopenie, konnten weder bestätigt, noch eindeutig widerlegt werden. Für einen vernachlässigbaren Einfluss der PEG-PLGA+PFD-Mikrokapseln auf die Gerinnung spricht, dass PEG-beschichtete Oberflächen mit einer geringen oder vernachlässigbaren Aktivierung der Gerinnung assoziiert werden. Jedoch werden sie mit einer profunden Aktivierung des Komplementsystems (4.3) in Zusammenhang gebracht (Ekdahl *et al.*, 2011).

#### **4.5 Bedeutung des Kapselkerns sowie des Emulgators von PEG-PLGA-Mikrokapseln für Gewebestrukturen**

Bisher gibt es in der Literatur keine Aussagen über den Einfluss intravenös applizierter PFD-gefüllter bzw. solider PEG-PLGA-Mikrokapseln auf mögliche Zell- und Gewebeschädigungen in gesunden Ratten. Zwar herrscht Einstimmigkeit darüber, dass Nanopartikel und Mikrosphären nach intravenöser Applikation primär durch Kupffer-Zellen der Leber und Makrophagen der Milz aus der Blutzirkulation herausgefiltert werden (Juliano 1988; Avgoustakis 2004). Jedoch wird in Arbeiten, die sich mit der Histologie verschiedener Organe befassen vielmehr die biologische Abbaubarkeit oder Wirkstofffreisetzung untersucht, als eine mögliche Gewebeschädigung mit einhergehender Enzymfreisetzung nach intravenöser Applikation. So untersuchten etwa Semete *et al.* die biologische Verteilung oral applizierter PLGA-Nanopartikel in Mäusen (Semete *et al.*, 2010), oder Shive und Anderson und Menei *et al.* die subkutane Applikation bzw. die Implantation von PLGA-Mikrosphären in das Gehirn von Ratten (Menei *et al.*, 1993; Shive und Anderson 1997). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden neben der histologischen Begutachtung der Organe, v.a. der Leber und Milz, auch die Freisetzung verschiedener Enzyme als zusätzlicher Indikator einer Zell- und Gewebeschädigung untersucht.

Die Alaninaminotransferase (ALAT) und die Aspartataminotransferase (ASAT) kommen grundsätzlich in allen Organen und Zellen vor, wobei ihre primäre Funktion die Desaminierung von Aminosäuren ist. Allerdings ergibt sich dadurch, dass sowohl ASAT als auch ALAT vorwiegend in der Leber lokalisiert sind, eine gewisse Organselektivität. ALAT ist ein Enzym, das im Zytosol der Zellen vorkommt, während ASAT sowohl zytosolisch als auch mitochondrial gebunden vorliegt. Eine Infusion von PEG-PLGA- bzw. PEG-PLGA+PFD-Mikrokapseln verursacht eine erhebliche Schädigung der Leber,

induziert durch den signifikanten Anstieg von ALAT (Abb.13A/19A) und ASAT (Abb.13B/19B). Durch den reichlichen Blutfluss in der Leber, der gewundenen Zirkulation in den Sinusoiden und der Reichhaltigkeit von phagozytierenden Kupffer-Zellen ist die Leber nicht nur ein effizientes Organ zur Eliminierung von Mikropartikeln (Juliano 1988). Diese Gegebenheiten bedingen zusätzlich auch eine kurzfristige Akkumulation der infundierten PEG-PLGA- bzw. PEG-PLGA+PFD-Mikrokapseln in den Sinusoiden, so dass die Leber durch vermehrt entstehende mechanische Scherkräfte geschädigt werden kann. Unterstützt wird diese Beobachtung nach Infusion von PEG-PLGA+PFD-Mikrokapseln, auch durch die Auswertung HE-gefärbter Leberpräparate (3.2.6), die eine deutliche Schädigung des Lebergewebes aufweisen. Dass die plasmatische Enzymaktivität in der Versuchsgruppe der PFD-gefüllten Mikrokapseln deutlich über der Aktivität in der Versuchsgruppe der soliden Mikrokapseln liegt, ist vermutlich, wie bereits der systemische Effekt auf den MAP (4.3), dem höheren Kapselgewicht der PFD-gefüllten Kapseln geschuldet. Folglich wirken sich die mechanischen Scherkräfte deutlich stärker auf das diskontinuierliche Endothel der Lebersinusoiden aus.

Auch die Auswertung der Plasmaaktivität der Laktatdehydrogenase (LDH) zeigt, dass eine Infusion von PEG-PLGA- bzw. PEG-PLGA+PFD-Mikrokapseln eine deutliche Auswirkung auf die Intaktheit von Gewebestrukturen hat. Die LDH ist im Zytoplasma nahezu aller Zellen verschiedener Organe lokalisiert und katalysiert die Oxidation von Laktat zu Pyruvat unter simultaner Reduktion von  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH}/\text{H}^+$  bzw. die entsprechende Rückreaktion. Eine Infusion der PEG-PLGA- bzw. PEG-PLGA+PFD-Mikrokapseln resultiert in einer gegenüber der NaCl-Kontrollgruppe signifikant erhöhten Enzymaktivität der LDH (Abb.13C/19C). Demnach kommt es nach einer Mikrokapselinfusion zu einer massiven Zellschädigung, infolge derer die LDH ins Plasma freigesetzt wird. Analog zu den Ergebnissen der ALAT- und ASAT-Bestimmung übersteigt die LDH-Aktivität in der Versuchsgruppe der PFD-gefüllten Mikrokapseln diejenige der Versuchsgruppe der soliden Kapseln. Des Weiteren sind die LDH und ASAT auch in den Erythrozyten lokalisiert, wonach eine Hämolyse ebenfalls eine gesteigerte Plasmaenzymaktivität hervorrufen kann. Durch die Bestimmung des Hämoglobingehalts im Plasma (Abb.14), kann eine Hämolyse als Ursache für die erhöhten LDH- und ASAT-Aktivitäten allerdings ausgeschlossen werden.

Die Bestimmung der Kreatinkinasen (CK-NAC) gibt die Gesamtaktivität der vier Isoenzyme an, die sich in allen Muskelzellen und im Gehirn detektieren lassen. Eine Infusion der PEG-PLGA- bzw. PEG-PLGA+PFD-Mikrokapseln resultierte in einer gegenüber der NaCl-Kontrollgruppe signifikant erhöhten Plasmaenzymaktivität der CK-NAC (Abb.13D/19D). Die enorme Freisetzung der verschiedenen Enzyme ist ein deutlicher Indikator für eine drastische Zell- und Gewebeschädigung, die in der zweiten

Versuchsserie nach einer Infusion von PEG-PLGA+PFD-Mikrokapseln histologisch bestätigt werden konnte. Die Infusion verursacht deutliche histologische Veränderungen der Milz (Abb.23) und Leber. Die Gewebestrukturen dieser Organe sind nahezu aufgelöst und im Falle der Milzpräparate teilweise von großlumigen Hohlräumen durchzogen. Die Milz tritt, wie die Leber, aufgrund des erheblichen Blutflusses besonders intensiv mit den infundierten Mikrokapseln in Kontakt, so dass eine Akkumulation von Mikrokapseln auch hier zu drastischen Gewebeschädigungen führen kann. Zudem konnten Avgoustakis *et al.* zeigen, dass eine PEG-lierung von PLGA-Nanosphären zwar zu einer reduzierten Phagozytose durch Kupffer-Zellen der Leber, jedoch zu einer vermehrten Resorption durch die Milz führte (Avgoustakis 2004).

## 5. AUSBLICK

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, erstmals größere Mengen von soliden bzw. PFD-gefüllten PEG-PLGA-Mikrokapseln in einem Modell der Ratte zu infundieren. Die applizierte Menge der PFD-gefüllten Mikrokapseln lag mit 837 mg/kg KGW (PEG-PLGA) bzw. 1288 mg/kg KGW (PEG-PLGA+PFD) deutlich über den gewöhnlich applizierten Dosierungen von Wirkstofftransportern (z.B. 5 mg/kg KGW; (van de Ven *et al.*, 2012). Mit einer Sauerstofftransportkapazität von rund 7 ml/dl (760 mmHg, 37 °C) würde diese Dosis jedoch nicht ausreichen, um eine adäquate Gewebeoxygenierung z.B. bei Erythrozytenverlust zu gewährleisten (Blut: 20 ml/dl). Alle Tiere überlebten ausnahmslos eine Infusion von 10 ml/kg KGW beider Kapseltypen, zeigten jedoch zwei dominierende Nebenwirkungen. Zum Einen kam es noch während der Infusion mit PFD-gefüllten Mikrokapseln zu einem vorübergehenden systemischen Blutdruckabfall (4.3), zum Anderen löste die Infusion unabhängig von dem jeweiligen Kapseltyp zum Teil massive Gewebeschädigungen aus (4.5).

Um die Nebenwirkungen abzumildern bzw. zu vermeiden, sollten zukünftige Kapselpräparationen modifiziert werden, ohne dabei die Basis der Kapseln (Wandmaterial: PLGA; Emulgator: PVA) grundlegend zu verändern. Im Fokus der Veränderungen sollten dabei die Kapselgröße, das Kapselgewicht, der Kapselkern sowie eine Modifikation der hydrophilen Beschichtung stehen.

Die zirkulatorischen Eigenschaften von artifiziellen Kapselsystemen werden maßgeblich durch ihre Größe beeinflusst. Eine Reduktion der Kapselgröße bei zukünftigen Präparationen könnte zu einer verbesserten Perfusion der Gewebe beitragen, ohne dabei Schädigungen aufgrund zu hoher mechanischer Belastung auszulösen. Bei einer Reduzierung des Kapseldurchmessers auf 1 µm würde das Endothel nach wie vor eine effektive Barriere darstellen, die die Kapseln am Verlassen des Gefäßsystems hindert, so dass lange zirkulatorische Halbwertszeiten weiterhin erreichbar wären.

Zusätzlich zu der Größe würde sich, durch eine geringere Menge des eingekapselten PFDs, auch das Kapselgewicht reduzieren. Daraus könnte ein weiterer positiver Effekt hinsichtlich der Belastung des Endothels durch mechanische Scherkräfte resultieren.

Durch die Verwendung eines anderen PFCs als Kapselkernmaterial (Sauerstoffträger) ist ebenfalls eine Reduktion des Kapselgewichts möglich. Zu diesem Zweck besonders geeignet ist das, neben PFD, in biologischen Systemen intensiv untersuchte PFC Perflubron (Lowe 2003). Perflubron besitzt eine höhere Sauerstofflöslichkeit als PFD

(Perflubron: 50 vol.-%; PFD: 40 vol.-%; 25 °C), so dass eine geringere Menge Perflubron eingesetzt werden müsste, um eine mit PFD vergleichbare Sauerstofftransportkapazität zu erreichen (Riess 2001). Zudem befindet sich das PFD nicht ausschließlich im Kern der Kapseln, sondern lagert sich während der Synthese ebenfalls in Lücken der Kapselwand ein, so dass ein Austausch des Kernmaterials hinsichtlich einer möglichen Interaktion zwischen dem PFD und dem Blut ebenfalls sinnvoll wäre.

Eine weitere Modifikation zukünftiger Kapselpräparation könnte eine divergierende Beschichtung mit einem anderen hydrophilen und nicht-ionischen Polymer darstellen, wie z.B. Polysaccharid, Polyvinylalkohol und PEG-beinhaltende Copolymere. Das bisher verwendete PEG besitzt zwar zahlreiche positive Eigenschaften (Gref *et al.*, 1995), trotzdem werden in der Literatur auch einige Nachteile, die besondere Gewichtung bei der Entwicklung künstlicher Sauerstoffträger mit angestrebten langen zirkulatorischen Halbwertszeiten erlangen, beschrieben. Die Aktivierung der Gerinnung durch PEG-beschichtete Oberflächen ist vernachlässigbar, jedoch aber mit einer erheblichen Aktivierung des Komplementsystems assoziiert (Ekdahl *et al.*, 2011). Zudem führt die PEG-lierung von Nanopartikeln zwar zu einer reduzierten Phagozytose durch die Kupffer-Zellen der Leber, die Resorption durch die Milz wird dagegen drastisch erhöht (Owens und Peppas 2006). Wenngleich also in der Literatur die PEG-lierung von PLGA-Mikro- und Nanopartikeln als die bevorzugte Methode postuliert wird, um eine Opsonisierung der Partikel zu verlangsamen (Owens und Peppas 2006; Dinarvand *et al.*, 2011), sollte eine Modifikation der Beschichtung aus oben genannten Gründen in Betracht gezogen werden.

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

Seit Jahrzehnten wird intensiv an der Entwicklung artifizierter Sauerstofftransportsysteme zur routine- und notfallmäßigen Versorgung von Patienten geforscht. Bis heute konnte sich kein Produkt, das bei einem signifikanten Erythrozytenverlust eine adäquate Gewebeoxygenierung aufrechterhalten kann, für humanmedizinische Anwendungen in Europa durchsetzen.

In der vorliegenden Arbeit wurden der Einfluss und die Bioverträglichkeit von soliden und Perfluorodekalin (PFD) gefüllten Mikrokapseln untersucht. Zur Synthese der Kapselwand wurde Poly(laktid-co-glykolid) verwendet, während die Beschichtung der Mikrokapseln mit Polyethylenglykol erfolgte. Der Einsatz dieser beiden Materialien ist vor allem bei der Entwicklung artifizierter Wirkstofftransporter verbreitet, wenngleich die bisher infundierten Mengen, im Vergleich zu den Dosierungen die im Rahmen dieser Arbeit appliziert wurden, sehr gering waren. Neben der beachtlichen Menge der infundierten Kapseln wurde zu deren Synthese außerdem ein für Kapselsysteme bisher kaum eingesetzter Emulgator (Polyvinylalkohol) verwendet. Für die Untersuchung der Effekte von beiden Kapseltypen und dem Emulgator wurden anästhesierten Ratten jeweils 10 ml/kg Körpergewicht der versuchsgruppenabhängigen Lösungen in 60 min bzw. 30 min über die Femoralvene infundiert. Alle Tiere überlebten ausnahmslos eine Infusion beider Kapseltypen, wenngleich am Ende des Versuchs massive Gewebeschädigungen unabhängig von dem jeweiligen Kapseltyp auftraten; unter anderem indiziert durch signifikant erhöhte Plasmaenzymaktivitäten. Zudem entwickelten die Tiere unabhängig von dem infundierten Kapseltyp eine moderate Azidose. Noch während der Infusionsphase der PFD-gefüllten Mikrokapseln kam es zu einem transienten systemischen Blutdruckabfall. Dieser wurde vermutlich durch vasoaktive Substanzen verursacht, die zum Einen durch eine Aktivierung des Komplementsystems, zum Anderen durch mechanische Scherkräfte freigesetzt wurden. Der eingesetzte Emulgator beeinflusste weder systemische Parameter, noch konnten bei der histologischen Untersuchung Gewebeschädigungen festgestellt werden. Die PFD-gefüllten Mikrokapseln wiesen mit rund einer Stunde eine gegenüber den soliden Mikrokapseln längere intravasale Halbwertszeit auf. Die Abnahme unterlag, unabhängig von dem infundierten Kapseltyp, einer dosisunabhängigen Kinetik erster Ordnung. Prinzipiell konnte gezeigt werden, dass eine Infusion beider Kapseltypen möglich ist, jedoch mit zum Teil schwerwiegenden Nebenwirkungen einhergeht. Die Mikrokapseln besitzen das Potential, um nach Umsetzung gezielter Modifikationen weiter untersucht zu werden.

## 7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Andersson, J., Ekdahl, K.N., Larsson, R., Nilsson, U.R., Nilsson, B. (2002): C3 adsorbed to a polymer surface can form an initiating alternative pathway convertase. *J Immunol.* 168, 5786–5791.
2. Avgoustakis, K. (2004): Pegylated poly(lactide) and poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: preparation, properties and possible applications in drug delivery. *Curr Drug Deliv.* 1, 321–333.
3. Avgoustakis, K., Beletsi, A., Panagi, Z., Klepetsanis, P., Karydas, A.G., Ithakissios, D.S. (2002): PLGA-mPEG nanoparticles of cisplatin: in vitro nanoparticle degradation, in vitro drug release and in vivo drug residence in blood properties. *J Control Release.* 79, 123–135.
4. Bundesärztekammer: Querschnitts-Leitlinien (BÄK) zur Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten (2008). Online verfügbar unter [http://www.bundesaerztekammer.de/downloads/Querschnittsleitlinie\\_Gesamtdokument-deutsch\\_07032011.pdf](http://www.bundesaerztekammer.de/downloads/Querschnittsleitlinie_Gesamtdokument-deutsch_07032011.pdf), zuletzt aktualisiert am 07.03.2011, zuletzt geprüft am 04.07.2013.
5. Castro, C.I. and Briceno, J.C. (2010): Perfluorocarbon-based oxygen carriers: review of products and trials. *Artif Organs.* 34, 622–634.
6. Chang, T.M., Powanda, D., Yu, W.P. (2003): Analysis of polyethylene-glycol-poly(lactide) nano-dimension artificial red blood cells in maintaining systemic hemoglobin levels and prevention of methemoglobin formation. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol.* 31, 231–247.
7. Chiu, C.J., McArdle, A.H., Brown, R., Scott, H.J., Gurd, F.N. (1970): Intestinal mucosal lesion in low-flow states. I. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal. *Arch Surg.* 101, 478–483.
8. Clark, L.C. and Gollan, F. (1966): Survival of mammals breathing organic liquids equilibrated with oxygen at atmospheric pressure. *Science.* 152, 1755–1756.
9. Cole, D.J., Przybelski, R.J., Schell, R.M., Martin, R.D. (1995): Diaspirin crosslinked hemoglobin (DCLHb) does not affect the anesthetic potency of isoflurane in rats. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol.* 23, 89–99.
10. Dalwadi, G. and Sunderland, V.B. (2007): Purification of PEGylated nanoparticles using tangential flow filtration (TFF). *Drug Dev Ind Pharm.* 33, 1030–1039.
11. Davies, D.H. (2001): Immune System. In: *Encyclopedia of Life Sciences*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.
12. Deetjen, P.; Speckmann, E.-J.; Hescheler, J. (2005): Physiologie. 4. Ed. München: Elsevier GmbH.
13. Dinarvand, R., Sepehri, N., Manoochehri, S., Rouhani, H., Atyabi, F. (2011): Poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles for controlled delivery of anticancer agents. *Int J Nanomedicine.* 6, 877–895.



14. Dinkelmann, S. and Northoff, H. (2003): Künstliche Sauerstoffträger -- eine kritische aktuelle Analyse. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther.* 38, 47–54.
15. Egger, G. (2005): Die Akute Entzündung-Grundlagen, Pathophysiologie und klinische Erscheinungsbilder der unspezifischen Immunität. Teil 2 Die Pathophysiologie der Entzündung. Wien: Springer-Verlag/Wien.
16. Ekdahl, K.N., Lambris, J.D., Elwing, H., Ricklin, D., Nilsson, P.H., Teramura, Y., Nicholls, I.A., Nilsson, B. (2011): Innate immunity activation on biomaterial surfaces: a mechanistic model and coping strategies. *Adv Drug Deliv Rev.* 63, 1042–1050.
17. Faithfull, N.S., King, C.E., Cain, S.M. (1987): Peripheral vascular responses to fluorocarbon administration. *Microvasc Res.* 33, 183–193.
18. Ferenz, K.B., Waack, I.N., Mayer, C., Groot, H. de, Kirsch, M. (2013): Long-circulating poly(ethylene glycol)-coated poly(lactid-co-glycolid) microcapsules as potential carriers for intravenously administered drugs. *J Microencapsul.* [Epub ahead of print].
19. Flaim, S.F. (1994): Pharmacokinetics and side effects of perfluorocarbon-based blood substitutes. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol.* 22, 1043–1054.
20. Fries, D. (2011): Gerinnungsoptimierung mit ROTEM(®) - Pro. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther.* 46, 312–316.
21. Gauvreau, D., Roy, C., Tom, F.-Q., Lu, H., Miegueu, P., Richard, D., Song, W.-C., Stover, C., Cianflone, K. (2012): A new effector of lipid metabolism: complement factor properdin. *Mol Immunol.* 51, 73–81.
22. Green, L.C., Wagner, D.A., Glogowski, J., Skipper, P.L., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.R. (1982): Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.* 126, 131–138.
23. Greer, J. (1986): Comparative structural anatomy of the complement anaphylatoxin proteins C3a, C4a and C5a. *Enzyme.* 36, 150–163.
24. Gref, Lück, Quellec, Marchand, Dellacherie, Harnisch, Blunk, Müller (2000): 'Stealth' corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 18, 301–313.
25. Gref, R., Domb, A., Quellec, P., Blunk, T., Müller, R., Verbavatz, J., Langer, R. (1995): The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically stabilized nanospheres. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 16, 215–233.
26. Gref, R., Minamitake, Y., Peracchia, M.T., Trubetskoy, V., Torchilin, V., Langer, R. (1994): Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres. *Science.* 263, 1600–1603.
27. Gryparis, E.C., Hatzia Apostolou, M., Papadimitriou, E., Avgoustakis, K. (2007): Anticancer activity of cisplatin-loaded PLGA-mPEG nanoparticles on LNCaP prostate cancer cells. *Eur J Pharm Biopharm.* 67, 1–8.

28. Habler, O., Pape, A., Meier, J., Zwissler, B. (2005): Künstliche Sauerstoffträger als Alternative zur Bluttransfusion. *Anaesthesist*. 54, 741–754.
29. Harrison, D.G., Widder, J., Grumbach, I., Chen, W., Weber, M., Searles, C. (2006): Endothelial mechanotransduction, nitric oxide and vascular inflammation. *J Intern Med*. 259, 351–363.
30. Harush-Frenkel, O., Altschuler, Y., Benita, S. (2008): Nanoparticle-cell interactions: drug delivery implications. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*. 25, 485–544.
31. Henseler, O., Heiden, M., Haschberger, B., Hesse, J., Seitz, R. (2010): Bericht zur Meldung nach § 21 TFG für die Jahre 2008 und 2009. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*. 53, 1089–1103.
32. Hofmann, A., Farmer, S., Shander, A. (2009): Cost-effectiveness in haemotherapies and transfusion medicine. *ISBT Science Series*. 4, 258–265.
33. Imai, A., Steffey, E.P., Farver, T.B., Ilkiw, J.E. (1999): Assessment of isoflurane-induced anesthesia in ferrets and rats. *Am J Vet Res*. 60, 1577–1583.
34. Ingram, D.A., Forman, M.B., Murray, J.J. (1993): Activation of complement by Fluosol attributable to the pluronic detergent micelle structure. *J Cardiovasc Pharmacol*. 22, 456–461.
35. Ishikawa, S., Ito, H., Yokoyama, K., Makita, K. (2009): Phenylephrine ameliorates cerebral cytotoxic edema and reduces cerebral infarction volume in a rat model of complete unilateral carotid artery occlusion with severe hypotension. *Anesth Analg*. 108, 1631–1637.
36. Ivy, D.D. (2010): Prostacyclin in the intensive care setting. *Pediatr Crit Care Med*. 11, S41-5.
37. Jahr, J.S., Akha, A.S., Holtby, R.J. (2012): Crosslinked, polymerized, and PEG-conjugated hemoglobin-based oxygen carriers: clinical safety and efficacy of recent and current products. *Curr Drug Discov Technol*. 9, 158–165.
38. Jain, R.A. (2000): The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials*. 21, 2475–2490.
39. Juliano, R. (1988): Factors affecting the clearance kinetics and tissue distribution of liposomes, microspheres and emulsions. *Adv Drug Deliv Rev*. 2, 31–54.
40. Kaneo, Y., Hashihama, S., Kakinoki, A., Tanaka, T., Nakano, T., Ikeda, Y. (2005): Pharmacokinetics and biodisposition of poly(vinyl alcohol) in rats and mice. *Drug Metab Pharmacokinet*. 20, 435–442.
41. Kehrel, B. (2011): Gerinnungsoptimierung mit ROTEM(®) - Contra. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*. 46, 318–322.
42. Kerwin, J.F. and Heller, M. (1994): The arginine-nitric oxide pathway: a target for new drugs. *Med Res Rev*. 14, 23–74.
43. Kim, H.W. and Greenburg, A.G. (2004): Artificial Oxygen Carriers as Red Blood Cell Substitutes: A Selected Review and Current Status. *Artif Organs*. 28, 813–828.

44. Klos, A., Tenner, A.J., Johswich, K.-O., Ager, R.R., Reis, E.S., Köhl, J. (2009): The role of the anaphylatoxins in health and disease. *Mol Immunol.* 46, 2753–2766.
45. Kopincová, J., Púzserová, A., Bernátová, I. (2012): L-NAME in the cardiovascular system - nitric oxide synthase activator? *Pharmacol Rep.* 64, 511–520.
46. Lang, T. (2011): Aktuelle Gerinnungsdiagnostik in der Intensivmedizin. *Med Klin Intensivmed Notfmed.* 106, 171–176.
47. Lang, T. and Depka, M. von (2006): Diagnostische Möglichkeiten und Grenzen der Thrombelastometrie/-graphie. *Hamostaseologie.* 26, S20-9.
48. Lee, S.C., Oh, J.T., Jang, M.H., Chung, S.I. (1999): Quantitative analysis of polyvinyl alcohol on the surface of poly(D, L-lactide-co-glycolide) microparticles prepared by solvent evaporation method: effect of particle size and PVA concentration. *J Control Release.* 59, 123–132.
49. Li, Y.-P., Pei, Y.-Y., Zhang, X.-Y., Gu, Z.-H., Zhou, Z.-H., Yuan, W.-F., Zhou, J.-J., Zhu, J.-H., Gao, X.-J. (2001): PEGylated PLGA nanoparticles as protein carriers: synthesis, preparation and biodistribution in rats. *J Control Release.* 71, 203–211.
50. Lowe, K.C. (1987): Perfluorocarbons as oxygen-transport fluids. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol.* 87, 825–838.
51. Lowe, K.C. (2001): Fluorinated blood substitutes and oxygen carriers. *J Fluor Chem.* 109, 59–65.
52. Lowe, K.C. (2003): Engineering blood: synthetic substitutes from fluorinated compounds. *Tissue Eng.* 9, 389–399.
53. MacMicking, J., Xie, Q.W., Nathan, C. (1997): Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol.* 15, 323–350.
54. Makadia, H.K. and Siegel, S.J. (2011): Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers (Basel).* 3, 1377–1397.
55. Mattrey, R.F., Hilpert, P.L., Long, C.D., Long, D.M., Mitten, R.M., Peterson, T. (1989): Hemodynamic effects of intravenous lecithin-based perfluorocarbon emulsions in dogs. *Crit Care Med.* 17, 652–656.
56. Menei, P., Daniel, V., Montero-Menei, C., Brouillard, M., Pouplard-Barthelaix, A., Benoit, J.P. (1993): Biodegradation and brain tissue reaction to poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres. *Biomaterials.* 14, 470–478.
57. Mitsube, K., Zackrisson, U., Brännström, M. (2002): Nitric oxide regulates ovarian blood flow in the rat during the periovulatory period. *Hum Reprod.* 17, 2509–2516.
58. Moghimi, S.M., Andersen, A.J., Ahmadvand, D., Wibroe, P.P., Andresen, T.L., Hunter, A.C. (2011): Material properties in complement activation. *Adv Drug Deliv Rev.* 63, 1000–1007.
59. Morimatsu, H., Ishikawa, K., May, C.N., Bailey, M., Bellomo, R. (2012): The systemic and regional hemodynamic effects of phenylephrine in sheep under normal conditions and during early hyperdynamic sepsis. *Anesth Analg.* 115, 330–342.
60. Mosqueira, V.C., Legrand, P., Morgat, J.L., Vert, M., Mysiakine, E., Gref, R., Devissaguet, J.P., Barratt, G. (2001): Biodistribution of long-circulating PEG-

- grafted nanocapsules in mice: effects of PEG chain length and density. *Pharm Res.* 18, 1411–1419.
61. Mozzarelli, A., Ronda, L., Faggiano, S., Bettati, S., Bruno, S. (2010): Haemoglobin-based oxygen carriers: research and reality towards an alternative to blood transfusions. *Blood Transfus.* 8 Suppl 3, s59-68.
62. Mundargi, R.C., Babu, V.R., Rangaswamy, V., Patel, P., Aminabhavi, T.M. (2008): Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives. *J Control Release.* 125, 193–209.
63. Nguyen, K.T., Shukla, K.P., Moctezuma, M., Braden, Arthur R C, Zhou, J., Hu, Z., Tang, L. (2009): Studies of the cellular uptake of hydrogel nanospheres and microspheres by phagocytes, vascular endothelial cells, and smooth muscle cells. *J Biomed Mater Res A.* 88, 1022–1030.
64. Nilsson, B., Ekdahl, K.N., Mollnes, T.E., Lambris, J.D. (2007): The role of complement in biomaterial-induced inflammation. *Mol Immunol.* 44, 82–94.
65. Nilsson, B., Korsgren, O., Lambris, J.D., Ekdahl, K.N. (2010): Can cells and biomaterials in therapeutic medicine be shielded from innate immune recognition? *Trends Immunol.* 31, 32–38.
66. Owens, D.E. and Peppas, N.A. (2006): Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int J Pharm.* 307, 93–102.
67. Oxygen Biotherapeutics, Inc.: Safety and Tolerability of Oxycyte in Patients With Traumatic Brain Injury (2013). Online verfügbar unter <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00908063?term=Oxycyte&rank=2>, zuletzt geprüft am 04.07.2013.
68. Pacher, P., Beckman, J.S., Liaudet, L. (2007): Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev.* 87, 315–424.
69. Panagi, Z., Beletsi, A., Evangelatos, G., Livanou, E., Ithakissios, D.S., Avgoustakis, K. (2001): Effect of dose on the biodistribution and pharmacokinetics of PLGA and PLGA-mPEG nanoparticles. *Int J Pharm.* 221, 143–152.
70. Park, P.O., Haglund, U., Bulkley, G.B., Fält, K. (1990): The sequence of development of intestinal tissue injury after strangulation ischemia and reperfusion. *Surgery.* 107, 574–580.
71. Park, R. (1980): Lactic acidosis. *West J Med.* 133, 418–424.
72. Paul-Ehrlich-Institut: Hämovigilanzbericht (2010). Online verfügbar unter [http://www.pei.de/SharedDocs/Downloads/vigilanz/haemovigilanz/publikationen/haemovigillanz-bericht-2010.pdf?\\_\\_blob=publicationFile&v=2](http://www.pei.de/SharedDocs/Downloads/vigilanz/haemovigilanz/publikationen/haemovigillanz-bericht-2010.pdf?__blob=publicationFile&v=2), zuletzt aktualisiert am 20.11.2012, zuletzt geprüft am 04.07.2013.
73. Peitzman, A.B., Billiar, T.R., Harbrecht, B.G., Kelly, E., Udekwu, A.O., Simmons, R.L. (1995): Hemorrhagic shock. *Curr Probl Surg.* 32, 925–1002.
74. Petrat, F., Swoboda, S., Groot, H. de, Schmitz, K.J. (2010): Quantification of ischemia-reperfusion injury to the small intestine using a macroscopic score. *J Invest Surg.* 23, 208–217.

75. Pisani, E., Tsapis, N., Paris, J., Nicolas, V., Cattel, L., Fattal, E. (2006): Polymeric nano/microcapsules of liquid perfluorocarbons for ultrasonic imaging: physical characterization. *Langmuir*. 22, 4397–4402.
76. Riess, J.G. (2001): Oxygen carriers ("blood substitutes")--raison d'etre, chemistry, and some physiology. *Chem Rev*. 101, 2797–2920.
77. Riess, J.G. (2005): Understanding the fundamentals of perfluorocarbons and perfluorocarbon emulsions relevant to in vivo oxygen delivery. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*. 33, 47–63.
78. Riess, J.G. (2006): Perfluorocarbon-based oxygen delivery. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*. 34, 567–580.
79. Robergs, R. and Amann, M.: Belastungsbedingte metabolische Azidose: Woher kommen die Protonen? (2003). Online verfügbar unter <http://www.uni-bonn.de/~tkolter/images/images/azidose.pdf>, zuletzt aktualisiert am 12.10.2012, zuletzt geprüft am 04.07.2013.
80. Robergs, R.A., Ghiasvand, F., Parker, D. (2004): Biochemistry of exercise-induced metabolic acidosis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 287, R502-16.
81. Sahoo, S.K., Panyam, J., Prabha, S., Labhasetwar, V. (2002): Residual polyvinyl alcohol associated with poly (D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles affects their physical properties and cellular uptake. *J Control Release*. 82, 105–114.
82. Santos-Magalhães, N.S. and Mosqueira, Vanessa Carla Furtado (2010): Nanotechnology applied to the treatment of malaria. *Adv Drug Deliv Rev*. 62, 560–575.
83. Schmidt, R.F.; Lang, F.; Heckmann, M. (2010): Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie. 31. Ed. Heidelberg: Springer Medizin Verlag.
84. Schöler, M., Frietsch, T., Jambor, C., Knels, R. (2010): Gibt es eine Zukunft für künstliche Blutersatzstoffe? *Dtsch Med Wochenschr*. 135, 575–581.
85. Sedova, L.A., Kochetygov, N.I., Berkos, M.V., Pjatowskaja, N.N. (1998): Side reaction caused by the perfluorocarbon emulsions in intravenous infusion to experimental animals. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*. 26, 149–157.
86. Semete, B., Booyesen, L., Lemmer, Y., Kalombo, L., Katata, L., Verschoor, J., Swai, H.S. (2010): In vivo evaluation of the biodistribution and safety of PLGA nanoparticles as drug delivery systems. *Nanomedicine*. 6, 662–671.
87. Shan, X., Liu, C., Yuan, Y., Xu, F., Tao, X., Sheng, Y., Zhou, H. (2009): In vitro macrophage uptake and in vivo biodistribution of long-circulation nanoparticles with poly(ethylene-glycol)-modified PLA (BAB type) triblock copolymer. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 72, 303–311.
88. Sharma, S., Sharma, P., Tyler, L.N. (2011): Transfusion of blood and blood products: indications and complications. *Am Fam Physician*. 83, 719–724.
89. Shive and Anderson (1997): Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Adv Drug Deliv Rev*. 28, 5–24.

90. Song, X., Zhao, X., Zhou, Y., Li, S., Ma, Q. (2010): Pharmacokinetics and disposition of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles. *Curr Drug Metab.* 11, 859–869.
91. Spiess, B.D. (2009): Perfluorocarbon emulsions as a promising technology: a review of tissue and vascular gas dynamics. *J Appl Physiol.* 106, 1444–1452.
92. Suckow, M.A.; Weisbroth, S.H.; Franklin, C.L. (2006): The Laboratory Rat. American College of Laboratory Animal Medicine Series. 2. Ed. San Diego, Californien, USA: Elsevier Academic Press.
93. Szabó, C., Mitchell, J.A., Thiernemann, C., Vane, J.R. (1993): Nitric oxide-mediated hyporeactivity to noradrenaline precedes the induction of nitric oxide synthase in endotoxin shock. *Br J Pharmacol.* 108, 786–792.
94. Tabata, Y., Murakami, Y., Ikada, Y. (1998): Tumor accumulation of poly(vinyl alcohol) of different sizes after intravenous injection. *J Control Release.* 50, 123–133.
95. Tamilvanan, S. (2007): Progress in the Design of Biodegradable Polymer-Based Microspheres for Parenteral Controlled Delivery of Therapeutic Peptide/Protein. In: Gad, S.C. (Ed.): Pharmaceutical Manufacturing Handbook: Production and Processes. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.
96. Thasneem, Y.M., Sajeesh, S., Sharma, C.P. (2011): Effect of thiol functionalization on the hemo-compatibility of PLGA nanoparticles. *J Biomed Mater Res A.* 99, 607–617.
97. Transfusionsgesetz: Gesetz zur Regelung des Transfusionswesens (1998). Online verfügbar unter <http://www.gesetze-im-internet.de/tfg/BJNR175200998.html>, zuletzt aktualisiert am 04.07.2013, zuletzt geprüft am 04.07.2013.
98. Tremper, K.K., Friedman, A.E., Levine, E.M., Lapin, R., Camarillo, D. (1982): The preoperative treatment of severely anemic patients with a perfluorochemical oxygen-transport fluid, Fluosol-DA. *N Engl J Med.* 307, 277–283.
99. van de Ven, H., Paulussen, C., Feijens, P., Matheeussen, A., Rombaut, P., Kayaert, P., van den Mooter, G., Weyenberg, W., Cos, P., Maes, L., Ludwig, A. (2012): PLGA nanoparticles and nanosuspensions with amphotericin B: Potent in vitro and in vivo alternatives to Fungizone and AmBisome. *J Control Release.* 161, 795–803.
100. Vercellotti, G.M., Hammerschmidt, D.E., Craddock, P.R., Jacob, H.S. (1982): Activation of plasma complement by perfluorocarbon artificial blood: probable mechanism of adverse pulmonary reactions in treated patients and rationale for corticosteroids prophylaxis. *Blood.* 59, 1299–1304.
101. Verrecchia, T., Spenlehauer, G., Bazile, D., Murry-Brelier, A., Archimbaud, Y., Veillard, M. (1995): Non-stealth (poly(lactic acid/albumin)) and stealth (poly(lactic acid-polyethylene glycol)) nanoparticles as injectable drug carriers. *J Control Release.* 36, 49–61.

102. Vogler, G.A. (2006): Anesthesia and Analgesia. *In*: Suckow, M.A., Weisbroth, S.H. und Franklin, C.L. (Eds.): *The Laboratory Rat*. 2. Ed., 627–664. San Diego, Californien, USA: Elsevier Academic Press.
103. Vonarbourg, A., Passirani, C., Saulnier, P., Benoit, J.-P. (2006): Parameters influencing the stealthiness of colloidal drug delivery systems. *Biomaterials*. 27, 4356–4373.
104. Waxman, K., Cheung, C.K., Mason, G.R. (1984): Hypotensive reaction after infusion of a perfluorochemical emulsion. *Crit Care Med*. 12, 609–610.
105. Webster, R., Didier, E., Harris, P., Siegel, N., Stadler, J., Tilbury, L., Smith, D. (2007): PEGylated proteins: evaluation of their safety in the absence of definitive metabolism studies. *Drug Metab Dispos*. 35, 9–16.
106. Yang, A., Liu, W., Li, Z., Jiang, L., Xu, H., Yang, X. (2010): Influence of Polyethyleneglycol Modification on Phagocytic Uptake of Polymeric Nanoparticles Mediated by Immunoglobulin G and Complement Activation. *J Nanosci Nanotech*. 10, 622–628.
107. Youan, B.-B.C., Hussain, A., Nguyen, N.T. (2003): Evaluation of sucrose esters as alternative surfactants in microencapsulation of proteins by the solvent evaporation method. *AAPS PharmSci*. 5, E22.
108. Zhao, J., Liu, C.-S., Yuan, Y., Tao, X.-Y., Shan, X.-Q., Sheng, Y., Wu, F. (2007): Preparation of hemoglobin-loaded nano-sized particles with porous structure as oxygen carriers. *Biomaterials*. 28, 1414–1422.
109. Zhu, Y., Xu, J., Sun, H., Hu, C., Zhao, H., Shao, B., Bah, A.A., Li, Y. (2011): Effects of aluminum exposure on the allergic responses and humoral immune function in rats. *Biometals*. 24, 973–977.

## 8. ANHANG

### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

<b>Abs</b>	Absorption	<b>LI</b>	Lyse-Index
<b>ALAT</b>	Alaninaminotransferase	<b>L-NAME</b>	N <sub>ω</sub> -Nitro-L-argininmethylester
<b>ANOVA</b>	<i>Analysis of variance</i> (Varianzanalyse)	<b>MAP</b>	Mittlerer arterieller Blutdruck
<b>ASAT</b>	Aspartataminotransferase	<b>MCF</b>	<i>Maximum clot firmness</i>
<b>BE</b>	<i>Base Excess</i>	<b>MW</b>	Molekulargewicht
<b>C</b>	Komplementfaktor	<b>MZ</b>	Marginalzone
<b>c</b>	Konzentration	<b>Na<sup>+</sup></b>	Natrium
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Calcium	<b>NO</b>	Stickstoffmonoxid
<b>CFT</b>	<i>Clot formation time</i>	<b>NOS</b>	NO-Synthase
<b>cGMP</b>	zyklisches Guanosinmonophosphat	<b>P</b>	Periarterielle Lymphscheide
<b>CK-NAC</b>	Kreatinkinasen	<b>pCO<sub>2</sub></b>	Kohlenstoffdioxidpartialdruck
<b>Cl<sup>-</sup></b>	Chlorid	<b>PEG</b>	Polyethylenglykol
<b>CT</b>	<i>Clotting time</i>	<b>PFC</b>	Perfluorcarbon
<b>d</b>	Schichtdicke	<b>PFD</b>	Perfluordekalin
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure	<b>PLGA</b>	Poly(laktid-co-glykolid)
<b>EK</b>	Erythrozytenkonzentrat	<b>pO<sub>2</sub></b>	Sauerstoffpartialdruck
<b>eNOS</b>	endotheliale NO-Synthase	<b>PVA</b>	Polyvinylalkohol
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>	<b>RES</b>	Retikuloendotheliales System
<b>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	Standardbikarbonat	<b>RP</b>	Rote Pulpa
<b>HE</b>	Hämatoxilin-Eosin	<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>HEPES</b>	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	<b>SEM</b>	Standardfehler (Standard Error of the Mean)
<b>i.v.</b>	intravenös	<b>TNF</b>	Tumornekrosefaktor
<b>IFN</b>	Interferon	<b>VF</b>	Verdünnungsfaktor
<b>Ig</b>	Immunglobulin	<b>vs.</b>	versus
<b>IL</b>	Interleukin	<b>α</b>	Alpha
<b>iNOS</b>	induzierbare NO-Synthase	<b>β</b>	Beta
<b>K<sup>+</sup></b>	Kalium	<b>γ</b>	Gamma
<b>KGW</b>	Körpergewicht	<b>ε</b>	Extinktionskoeffizient
<b>LDH</b>	Laktatdehydrogenase		



## **DANKSAGUNG**

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2011 bis Februar 2013 am Institut für Physiologische Chemie des Universitätsklinikums Essen durchgeführt.

Dank gebührt an erster Stelle

**Herrn Prof. Dr. Dr. Herbert de Groot,**

für die Bereitstellung einer wissenschaftlichen Arbeitsstelle und die Überlassung des interessanten Themas sowie die vielen wertvollen Ratschläge, Anregungen und Diskussionen, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Für die Übernahme der Koreferate danke ich

**Herrn Prof. Dr. Horn**

**Herrn Prof. Dr. Schmuck**

vom Institut für Transfusionsmedizin bzw. vom Institut für Organische Chemie der Universität Duisburg-Essen.

Besonderer Dank gebührt der Betreuerin meiner Promotion,

**Frau Dr. Katja Ferenz**

für ihr aufopferungsvolles Engagement während der wissenschaftlichen Begleitung dieser Arbeit, den guten Ideen sowie ihrer fortwährenden Geduld und steten Diskussionsbereitschaft.

Danken möchte ich zudem **Frau Johanna Teloh, Frau Julia Laudien, Frau Kristina Piwellek, Frau Dr. Ricarda Rohrig, Herrn Dr. Thomas Rönn, Herrn Dr. Tim Hamburger, Frau Dr. Rabea Verhaegh und Frau Dr. Katharina Effenberger-Neidnicht** ohne die meine Promotionszeit deutlich langweiliger gewesen wäre und natürlich allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Physiologische Chemie, die immer ein offenes Ohr für meine Probleme hatten.

Ein ganz besonderer Dank gilt

**meinen Eltern Helmut und Angelika und meinem Bruder Simon,**

die mich immer vorbehaltlos unterstützt und mir den Weg zur Promotion erst ermöglicht haben.

**LEBENS LAUF**

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes  
nicht enthalten.